



# CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE YPHC, UNE PROTEINE DE BACILLUS SUBTILIS A DEUX DOMAINES GTPASE IMPLIQUEE DANS LA BIOGENESE DU RIBOSOME

Anne-Emmanuelle Foucher

## ► To cite this version:

Anne-Emmanuelle Foucher. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE YPHC, UNE PROTEINE DE BACILLUS SUBTILIS A DEUX DOMAINES GTPASE IMPLIQUEE DANS LA BIOGENESE DU RIBOSOME. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. <tel-00539850v2>

**HAL Id: tel-00539850**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00539850v2>**

Submitted on 4 Mar 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE de GRENOBLE**  
**ECOLE DOCTORALE CHIMIE et SCIENCES DU VIVANT**

**THESE**  
**Pour l'obtention**  
**du Diplôme de Doctorat en Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

**Anne-Emmanuelle Foucher**

Caractérisation biochimique de YphC, une protéine de  
*Bacillus subtilis* à deux domaines GTPases impliquée dans la  
biogenèse du ribosome.

***Thèse dirigée par le Dr Jean-Michel JAULT***

Soutenue le 28 octobre 2010

**Composition du Jury :**

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Dr. Anne GALINIER     | Rapporteur |
| Dr. Pierre FALSON     | Rapporteur |
| Pr, Ahcène BOUMENDJEL | Examineur  |
| Dr. Jean-Michel JAULT | Examineur  |

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier Anne Galinier, Pierre Falson et AHCÈNE Boumendjel, les membres du Jury, d'avoir accepté de lire et évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Jean-Michel pour ses qualités humaines et scientifiques. Merci de m'avoir soutenu dans cette démarche, d'être disponible autant que faire se peut. Je te remercie également pour ton optimisme quand je n'en avais pas, pour toutes ces années à travailler ensemble qui ont été un vrai plaisir et qui je l'espère se poursuivront encore longtemps.

Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe : Catherine, Maria, Emilie, Hien-Anh, Bastien pour me supporter au quotidien et pour leurs soutiens, pour leur gentillesse aussi.

Je tiens à remercier Anne Galinier et Christophe Grangeasse pour la collaboration qui a démarré et qui va continuer sur les phosphorylations et les réunions ANR qui sont agréables.

Merci à Robert Britton d'avoir partagé ses quelques résultats sur YphC avec moi et pour la collaboration fructueuse qui a suivi.

Je remercie Dominique Housset et Jean-Baptiste Reiser pour la cristallisation de YphC, les discussions intéressantes et la collaboration dynamique ainsi que pour votre sympathie.

Je voudrais remercier Audrey et Ludivine pour s'être impliquée dans ce sujet avec autant d'énergie, toujours avec le sourire, ça a été un plaisir de vous avoir en stage.

Je n'oublie pas mes ex-collègues et toujours amis du bâtiment K avec qui j'ai commencé ma carrière. Merci de m'avoir permis de travailler dans des conditions aussi agréables et l'impression d'avoir une deuxième famille quand je suis arrivée. Merci à Florent de m'avoir soutenu dans cette voie, Ely pour ton soutien moral, Martine et Patrice d'être ce que vous êtes. Vincent, Serge, Francesca, Ingrid, Caro, Béa, Rachel, Greg et j'en oublie sûrement... Ces 4 années au CEA ont vraiment été formidables grâce à vous tous.

Je tiens à remercier Eva Pebay-Peroula de nous avoir accueillis à l'IBS dans les meilleures conditions possibles. Je remercie également tout le monde au LPM pour nous avoir accueillis, fait une place dans votre labo. Surtout un grand merci à Céline et Isabelle pour toute l'aide que vous m'apportez dans le travail quotidien. C'est une chance de vous avoir. Merci Richard pour ta gentillesse, les discussions scientifiques ou non. Un grand merci à Jean, collègue de la première heure et ami. Je sais tout ce que tu as fait pour que je puisse y arriver et je ne l'oublierais pas.

Je voudrais remercier aussi ceux qui sont passés au labo mais que je n'ai pas oubliés. Merci AnneΔE pour ce que tu es, j'aurais vraiment aimé que tu restes avec nous. J'espère que les gens de ton labo savent la chance qu'ils ont. Je n'oublierais pas les rires, les larmes, les discussions scientifiques ou non, ton aide précieuse au labo, ton soutien etc. Ne t'inquiètes pas je continue de pomper au cas où !

Merci Heidi, ton énergie me manque beaucoup, ton humour, nos discussions sérieuses ou pas.

Merci à Sandrine, pour ton amitié, ta bonne humeur, ton optimisme, tes qualités humaines.

Merci Carmen pour ton professionnalisme, ton calme, tes sourires, ton optimisme, j'ai apprécié de travailler en ta compagnie.

Merci Jo, pour avoir été une chouette étudiante, une bonne chercheuse et pour ton amitié. Je n'oublierais pas ces 4 années de labo sur des airs de « californian dreaming », les fous rires, les ras le bol...et tout le reste, je sais que tu sais de quoi je parle. J'espère te revoir vite dans le coin !

Merci Cristina, tes qualités scientifiques et humaines me manquent beaucoup.

Je n'oublie pas Fabrice, merci pour ton amitié, les pauses café, les sourires, les voyages en train, ta disponibilité dans le travail, ton dévouement, ta gentillesse et ta simplicité. Merci d'avoir géré l'infogérance et de nous aider tous, comme tu le peux avec nos déboires informatiques.

Merci à Lionel, Anne-Laure, Benoit, Alex, Damien, Marion, Rossella, Stéphane, Anne, Julien, Nathalie, Thierry, Ronan, Anne-Sylvie, Adrien, Séverine, Christelle, Cathie, etc., pour votre présence et votre amitié depuis toutes ces années.

Et bien sur je remercie ma famille, qui m'a soutenu tout au long de ces 6 années et tout au long de ma vie. Et je n'oublie pas Jonathan qui m'apporte tellement au quotidien.

A mon père, à ma grand-mère, pour mon fils...

## TABLE DES MATIERES

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>                                                           | <b>1</b>  |
| <b>TABLE DES MATIERES.....</b>                                                      | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>                                                      | <b>6</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                                                      | <b>6</b>  |
| <b>GLOSSAIRE.....</b>                                                               | <b>9</b>  |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                           | <b>13</b> |
| <b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>                                                | <b>17</b> |
| <b>1-Les protéines liant les nucléotides .....</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>1-1 Les NTPases à P-loop.....</b>                                                | <b>20</b> |
| <b>1-2 Le groupe KG .....</b>                                                       | <b>21</b> |
| 1-2-a Les kinases.....                                                              | 22        |
| 1-2-b Les GTPases .....                                                             | 23        |
| <b>1-3 Structure des GTPases.....</b>                                               | <b>24</b> |
| 1-3-a Les GTPases SIMIBI .....                                                      | 27        |
| 1-3-b Les GTPases TRAFAC.....                                                       | 28        |
| <b>1-4 Mécanisme de fonctionnement.....</b>                                         | <b>29</b> |
| 1-4-a Switch I .....                                                                | 30        |
| 1-4 b Switch II.....                                                                | 30        |
| <b>1-5 Fixation et hydrolyse du nucléotide.....</b>                                 | <b>31</b> |
| 1-5-a Fixation .....                                                                | 31        |
| 1-5-b Hydrolyse.....                                                                | 33        |
| <b>1-5 GAP, GEF et effecteurs .....</b>                                             | <b>35</b> |
| <b>1-6 Un exemple de GTPase TRAFAC bactérienne : Era.....</b>                       | <b>36</b> |
| <b>2-Ribosomes.....</b>                                                             | <b>40</b> |
| <b>2-1 Rappel sur la traduction chez les bactéries.....</b>                         | <b>40</b> |
| <b>2-2 Structure du Ribosome .....</b>                                              | <b>42</b> |
| 2-2-a Sous-unité 30S .....                                                          | 44        |
| 2-2-b Sous-unité 50S .....                                                          | 45        |
| <b>2-3 Biogénèse.....</b>                                                           | <b>47</b> |
| 2-3-a Les ARN ribosomiaux .....                                                     | 48        |
| 2-3-b Les protéines ribosomiques .....                                              | 49        |
| 2-3-c Mécanismes de biogénèse .....                                                 | 53        |
| 2-3-d Les protéines non ribosomiques impliquées dans la biogénèse du ribosome ..... | 56        |
| <b>3-YphC .....</b>                                                                 | <b>58</b> |
| <b>3-1 Structure .....</b>                                                          | <b>59</b> |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 3-2 Etudes biochimiques .....                            | 63        |
| 3-3 Etudes fonctionnelles .....                          | 64        |
| <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>                       | <b>67</b> |
| <b>1-Matériels .....</b>                                 | <b>69</b> |
| 1-1 Souches bactériennes .....                           | 69        |
| 1-2 Vecteurs plasmidiques .....                          | 69        |
| 1-3 oligonucléotides utilisés.....                       | 71        |
| <b>2-Techniques de biologie moléculaire .....</b>        | <b>73</b> |
| <b>2-1 Préparation d'ADN.....</b>                        | <b>73</b> |
| 2-1-a ADN génomique .....                                | 73        |
| 2-1-b ADN plasmidique .....                              | 73        |
| 2-1-c Amplification par PCR .....                        | 74        |
| 2-1-d Mutagenèse dirigée.....                            | 75        |
| <b>2-2 Clonage des gènes.....</b>                        | <b>77</b> |
| 2-2-a Digestion par les enzymes de restriction.....      | 77        |
| 2-2-b Electrophorèse en gel d'agarose .....              | 77        |
| 2-2-c Purification de l'ADN sur gel .....                | 77        |
| 2-2-d Ligature.....                                      | 78        |
| <b>2-3 Préparation de bactéries compétentes.....</b>     | <b>78</b> |
| <b>2-4 Transformation bactérienne .....</b>              | <b>79</b> |
| <b>3-Techniques Biochimiques.....</b>                    | <b>79</b> |
| <b>3-1 Préparation des protéines.....</b>                | <b>79</b> |
| 3-1-a Tests de solubilité .....                          | 79        |
| 3-1-b Surproduction .....                                | 80        |
| 3-1-c Purification.....                                  | 80        |
| 3-1-d Gel de polyacrylamide .....                        | 83        |
| <b>3-2 Préparation des ribosomes .....</b>               | <b>84</b> |
| <b>3-3 Tests enzymatiques .....</b>                      | <b>84</b> |
| <b>3-4 Spectroscopie de fluorescence .....</b>           | <b>86</b> |
| <b>3-5 Interaction protéine-ribosomes .....</b>          | <b>87</b> |
| 3-5-a Précipitation des protéines .....                  | 88        |
| <b>3-6 Immuno-révélation.....</b>                        | <b>88</b> |
| 3-6-a Transfert.....                                     | 89        |
| 3-6-b Immuno-détection : Western Blot.....               | 89        |
| <b>3-7 Thermal Shift Assay (TSA) .....</b>               | <b>90</b> |
| <b>RESULTATS .....</b>                                   | <b>91</b> |
| <b>1-Production et purification de la protéine .....</b> | <b>93</b> |
| <b>1-1 Protéine native.....</b>                          | <b>93</b> |
| 1-1-a Tests de solubilité .....                          | 93        |
| 1-1-b Surproduction et purification .....                | 95        |

|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1-2 Mutants .....</b>                                                          | <b>96</b>  |
| <b>2-Tests fonctionnels.....</b>                                                  | <b>99</b>  |
| <b>3-Caractérisation biochimique.....</b>                                         | <b>101</b> |
| <b>3-1 YphC WT.....</b>                                                           | <b>101</b> |
| 3-1-a Etudes cinétiques .....                                                     | 101        |
| <b>3-2 Effet du Potassium .....</b>                                               | <b>104</b> |
| 3-2-a étude par enzymologie .....                                                 | 104        |
| 3-2-b Etude par fluorescence.....                                                 | 109        |
| <b>3-3 Les mutants de YphC .....</b>                                              | <b>111</b> |
| 3-3-a Mutants de délétions : GD1, GD2-KH, YphCΔKH .....                           | 111        |
| 3-3-a Les mutants de la lysine du motif A de Walker : YphCK16A et YphCK188A ..... | 115        |
| 3-3-b Etudes des constantes de dissociation des mutants de la lysine.....         | 115        |
| 3-3-c Les autres mutants.....                                                     | 117        |
| <b>4-Etude par thermal shift assay .....</b>                                      | <b>121</b> |
| <b>5-Etudes fonctionnelles.....</b>                                               | <b>127</b> |
| <b>DISCUSSION.....</b>                                                            | <b>129</b> |
| <b>1-Activités enzymatiques et affinités .....</b>                                | <b>131</b> |
| <b>2-Effet du potassium .....</b>                                                 | <b>135</b> |
| <b>3-Essais de dénaturation thermique .....</b>                                   | <b>137</b> |
| <b>4-Interaction avec les ribosomes.....</b>                                      | <b>138</b> |
| <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>                                          | <b>141</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>                                                        | <b>145</b> |



## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : oligonucléotides utilisés. ....                                                                                        | 72  |
| Tableau 2 : récapitulatif des valeurs de $K_M$ et $V_m$ trouvées pour YphC WT .....                                                | 109 |
| Tableau 3 : $K_d$ mesurés pour YphC vis à vis du GDP et du GMPPNP en présence de KCl ou de NaCl .....                              | 110 |
| Tableau 4 : constantes de dissociation ( $K_d$ ) des domaines isolés pour les nucléotides. ....                                    | 114 |
| Tableau 5 : $K_d$ mesurés pour les mutants de la lysine du motif A de Walker de YphC pour les nucléotides et à 300 mM de sel. .... | 116 |

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : topologies des différentes familles de NTPases montrant l'organisation du feuillet $\beta$ central et le module LID complémentaire présent chez les kinases. .... | 22 |
| Figure 2 : cycle des GTPases. ....                                                                                                                                           | 24 |
| Figure 3 : structure de Ras.....                                                                                                                                             | 25 |
| Figure 4 : schéma d'interaction de l'aspartate conservé du motif G4 avec la base guanine du nucléotide.....                                                                  | 26 |
| Figure 5 : topologies de différentes GTPases .....                                                                                                                           | 29 |
| Figure 6 : schéma général de fonctionnement des régions Switch chez les GTPases. ....                                                                                        | 31 |
| Figure 7 : fixation du nucléotide chez Ras.....                                                                                                                              | 32 |
| Figure 8 : modèles dissociatif et associatif des états de transition.....                                                                                                    | 33 |
| Figure 9: schéma d'hydrolyse du GTP. ....                                                                                                                                    | 34 |
| Figure 10 : structure 3D de Era.....                                                                                                                                         | 38 |
| Figure 11 : schéma de la traduction chez les bactéries.....                                                                                                                  | 41 |
| Figure 12 : structure 3D du ribosome 70S de <i>Thermus thermophilus</i> .....                                                                                                | 43 |
| Figure 13 : structure de la sous-unité 30S du ribosome. ....                                                                                                                 | 45 |
| Figure 14 : structure 3D de la sous-unité 50S. ....                                                                                                                          | 47 |
| Figure 15 : structures de différentes protéines ribosomiques.....                                                                                                            | 52 |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 16 : cartographie de la biogenèse de la sous-unité 30S du ribosome. ....                                                            | 54  |
| Figure 17 : cartographie de la biogenèse de la sous-unité 50S. ....                                                                        | 55  |
| Figure 18 : région du chromosome de <i>Bacillus subtilis</i> portant le gène d' <i>yphC</i> . ....                                         | 59  |
| Figure 19 : alignement de séquences de quelques orthologues d' <i>YphC</i> .....                                                           | 61  |
| Figure 20 : structure de Der de <i>Thermotoga maritima</i> .....                                                                           | 62  |
| Figure 21 : superposition des structures de EngA. ....                                                                                     | 63  |
| Figure 22 : carte du vecteur de clonage pCR Blunt (invitrogen) .....                                                                       | 70  |
| Figure 23 : carte du vecteur d'expression pET 15b (Novagen). ....                                                                          | 71  |
| Figure 24 : schéma de la mutagenèse dirigée par la méthode de « quickchange ». ....                                                        | 76  |
| Figure 25 : schéma de fixation d'une étiquette Histidine avec la résine Ni-NTA-agarose. ....                                               | 81  |
| Figure 26 : schéma d'une résine de chromatographie d'exclusion ou gel-filtration. ....                                                     | 82  |
| Figure 27 : schéma de fonctionnement du système couplé PK-LDH. ....                                                                        | 85  |
| Figure 28 : tests de solubilité de <i>YphC</i> . ....                                                                                      | 94  |
| Figure 29 : purification de <i>YphC</i> sur colonne de nickel. ....                                                                        | 95  |
| Figure 30 : chromatogramme de purification de <i>YphC</i> par gel filtration .....                                                         | 96  |
| Figure 31 : schéma des mutants de <i>YphC</i> générés. ....                                                                                | 98  |
| Figure 32 : tests d'activité GTPase d' <i>YphC</i> et de ses mutants. ....                                                                 | 100 |
| Figure 33 : activité enzymatique de <i>YphC</i> WT en Hepes/KOH pH 8. ....                                                                 | 102 |
| Figure 34 : tests enzymatiques réalisés dans différentes conditions. ....                                                                  | 103 |
| Figure 35 : effets des sels sur l'activité enzymatique d' <i>YphC</i> à 37°C et 1 mM de GTP. ....                                          | 105 |
| Figure 36 : cinétiques enzymatiques à différentes concentrations de NaCl. ....                                                             | 106 |
| Figure 37 : cinétiques enzymatiques à 37°C. ....                                                                                           | 108 |
| Figure 38 : fixation du GDP sur <i>YphC</i> par mesure de fluorescence du tryptophane. ....                                                | 110 |
| Figure 39 : effet du potassium sur les domaines de <i>YphC</i> . ....                                                                      | 112 |
| Figure 40 : mesures cinétiques à différentes concentration de GTP. ....                                                                    | 113 |
| Figure 41 : effet du potassium sur l'activité des différents mutants de <i>YphC</i> . ....                                                 | 117 |
| Figure 42 : comparaison des activités GTPases de la protéine sauvage et de ses mutants à 1 mM en GTP et en présence de 500 mM de KCl. .... | 118 |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 43 : hydrolyse des nucléotides par les différents mutants des motifs G4. ....                                       | 120 |
| Figure 44 : données expérimentales de dénaturation thermique. ....                                                         | 122 |
| Figure 45 : variation du Tm de YphC de type sauvage en fonction de la concentration en sel. ....                           | 123 |
| Figure 46 : variation du Tm de YphC native en présence de différents nucléotides et à une concentration fixe de sels. .... | 124 |
| Figure 47 : variation du Tm de YphC WT et des mutants en fonction de la concentration en sels. ...                         | 126 |
| Figure 48 : interaction de YphC avec les ribosomes.....                                                                    | 128 |
| Figure 49 : représentation des deux sites catalytiques de domaines de EngA .....                                           | 133 |
| Figure 50 : représentations du site catalytique de MnmE. ....                                                              | 136 |

## GLOSSAIRE

A: Adénine

AAA+: ATPases associated with a variety of cellular activities

ABC: ATP-Binding cassette

ADN: Acide Desoxyribonucléique

AlF<sub>x</sub>: fluorure d'aluminium

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ARNt: Acide ribonucleique de transfert

ASCE: « Additional Strand Catalytic E » désigne les GTPase possédant un brin additionnel et un glutamate catalytique

ATP: Adenosine Triphosphate

*B.subtilis* : *Bacillus subtilis*

BET: Bromure d'Ethidium

C: Cytosine

CaCl<sub>2</sub>: chlorure de Calcium

CTAB: cétyltriméthylammonium bromide.

D.O : Densité Optique.

Da-kDa-Mda : Dalton – kilo Dalton- Mega Dalton

DOC: Deoxycholate

DTT: Dithiothréitol

*E.coli* : *Escherischia coli*

ECL: Enhanced chemiluminescence

FPLC: Fast performance Liquid Chromatography.

FT: "Flow through"- passe tout droit

G: Guanine

GAP: GTPase Activating Protein. Protéine activant les GTPases

GD: G domain ou domaine G – domaine de fixation des nucléotides à base guanine

GDI : inhibiteur des domaines G

GDP: Guanosine diphosphate

GEF : Guanine exchange Factor - facteur d'échange des nucléotides à base guanine

GMP: Guanosine Monophosphate

GTP: Guanosine Triphosphate

HAS-GTPase: Hydrophobic amino acid substitution-GTPase

Hepes: acide 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-éthanesulfonique

HCl: acide chlorhydrique

IF1, 2,3 : Initiation factor 1,2,3 - Facteurs d'initiation de la traduction.

IPTG: Isopropylthiogalactopyranoside

$k_{cat}$  : constante catalytique

KCl: chlorure de potassium

Kd: constante de dissociation

KG: Kinase GTPase- groupe appartenant à la famille des NTPase à P-loop.

KH: K-Homology

$K_M$  : Constante de Michaelis

KOH: hydroxyde de potassium ou potasse

LB: Luria Bertani

LDH: Lactate déshydrogenase

M;  $\mu M$ : Molaire - micro molaire - mol/litre ou  $\mu mol/litre$

$MgCl_2$ : chlorure de magnésium

min: minute

mL: millilitre

MM: Masse Moléculaire

NaCl : chlorure de sodium

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NaOH : hydroxyde de sodium ou soude

NATA: N-Acétilyltryptophanamide

NTP: Nucléoside triphosphate

OH: hydroxyde

PCR: Polymerase Chain Reaction - réaction de polymérisation en chaîne.

PEP: phosphoenolpyruvate

PES: polyéthylènesulfone

pH: potentiel Hydrognène

PIPES: acide 1, 4-Piperazinediethanesulfonique.

PK: Pyruvate Kinase

P-loop: boucle liant le phosphate – « Phosphate - binding loop »

PMSF: phénylméthylsulfoxyde fluoride

ppGpp : guanosine tétraphosphate

pppGpp : guanosine pentaphosphate

Protéine G: Protéine liant et hydrolysant les nucléotides à base guanine.

Psi: « pound per square inches » –unité de pression

PTC: Peptidyl transferase center. Centre de l'activité peptidyl transférase dans le ribosome.

RBS: « ribosome Binding Site » - site de fixation du ribosome.

RF1-RF2: “Release Factor 1 et 2”. Facteur de relargage des ribosomes

RFU : « Relative fluorescence unit »-unité relative de fluorescence.

RI 50: Ribosome intermediate 50- intermédiaire de la sous-unité 50S dans la voie de biogenèse.

*S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae*

SD: Shine Dalgarno.

SDS: Sodium dodécyl sulfate.

SDS-PAGE: “Sodium dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”

SIMIBI: Signal recognition particle MinD BioD

Site A: site aminopaptidyl

Site P: site peptidyl

Site E: site Exit

Switch: région flexible des GTPases

T: Thymidine

*T.maritima*: *Thermotoga maritima*

TBST: Tris Buffer Saline Tween 20

TCA: acide Trichloroacétique.

Tm: Temperature de fusion -“melting temperature”

TRAFAC: “Translation factor”- Facteur de traduction.

TSA: “Thermal shift assay”.

U: uridine

UA: unité d’Absorbance

V: Volt

W/V: « Weight/volume » - masse/volume.

XTP: xanthosine triphosphate.

# INTRODUCTION





Durant les dix dernières années, les programmes de séquençage des génomes ont révélé l'existence de bon nombre de gènes inconnus dont le rôle dans la cellule n'a toujours pas été identifié. Des études systématiques d'invalidation des gènes chez les bactéries ont permis de révéler ceux qui sont essentiels à la vie ou la survie de la cellule. Si certains sont ubiquistes, c'est-à-dire retrouvés de la bactérie à l'Homme, d'autres s'avèrent être exclusivement bactériens voire spécifiques des eubactéries.

Parallèlement, l'utilisation de plus en plus fréquente des antibiotiques a favorisé le renforcement et le développement des moyens de résistance des bactéries aux traitements, posant un réel problème de santé publique, notamment dans les structures de santé particulièrement exposées aux infections nosocomiales. Ce phénomène s'est amplifié à cause du ralentissement du développement de nouvelles molécules antibactériennes. La nécessité de renforcer la recherche de nouvelles cibles pour les antibiotiques ou de nouveaux moyens de combattre les agents pathogènes est donc accrue.

Les gènes essentiels exclusivement bactériens codant des protéines de fonctions inconnues (dites orphelines) se révèlent être de bons candidats pour la découverte de tels médicaments. En effet, si le gène est essentiel, la protéine en résultant l'est également et l'empêcher de jouer son rôle au sein de la cellule c'est empêcher les bactéries de se développer et donc lutter efficacement contre les pathogènes.

C'est dans ce contexte que nous avons développé au laboratoire, l'étude de plusieurs protéines orphelines de *Bacillus subtilis*, bactérie modèle des bactéries à Gram positif, afin de comprendre leur rôle et leurs mécanismes de fonctionnement. Le travail présenté ici porte sur l'une de ces protéines : YphC, une GTPase particulière de *Bacillus subtilis*.

Au début de cette thèse, peu de choses étaient connues sur cette protéine, alors classée parmi les protéines orphelines. Depuis, un certain nombre d'études ont apporté des éléments de réponses quant à la fonction de la protéine *in vivo*.

Nous avons étudié cette protéine d'un point de vue biochimique afin de mieux comprendre son comportement et son mécanisme catalytique. Nous avons également abordé la fonction de la protéine par des techniques *in vitro*.



# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES



Les nucléotides sont des molécules essentielles à la vie cellulaire. Ils constituent les briques de base des acides nucléiques mais leur rôle ne s'arrête pas là. Ils interviennent dans des mécanismes de réponses cellulaires ou encore dans des réactions métaboliques importantes. La liaison phosphoanhydride des NTP est une liaison à haute énergie. Parmi les nucléotides, les plus importants sont l'ATP et le GTP. L'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP permet le fonctionnement de différentes machines biologiques, de catalyser certaines réactions chimiquement défavorables notamment celles impliquant des changements conformationnels importants ou encore de réguler la fonction de diverses protéines (par des mécanismes de phosphorylation par exemple). Le GTP en revanche est surtout utilisé pour réguler les processus ou acheminer des signaux cellulaires. Les protéines liant et utilisant ces nucléotides représentent l'une des plus vastes familles de protéines et jouent un rôle clé au sein des cellules.

### **1-Les protéines liant les nucléotides**

Chez les organismes eucaryotes, comme chez les procaryotes, les protéines liant et hydrolysant les nucléotides triphosphates jouent un rôle essentiel. Elles présentent différents repliements structuraux qui permettent de les classer en plusieurs groupes :

- ⇒ protéines liant les di-nucléotides (protéine à repliement de Rossman),
- ⇒ protéines liant les mono-nucléotides ou NTPases à boucle phosphate « P-loop »,
- ⇒ tubuline/FtsZ,
- ⇒ Histidine kinases/HSP 90/Topoisomérase II,
- ⇒ HSP 70/RNase H,
- ⇒ protéine kinase.
- ⇒ ATPases de type P

Le repliement le plus fréquemment trouvé au sein de la cellule est celui des NTPases à P-loop qui représente 10 à 18% du protéome cellulaire (Koonin *et al.*, 2000; Saraste *et al.*, 1990).

## 1-1 Les NTPases à P-loop

Les NTPases à P-loop sont largement représentées dans les cellules, tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Elles interviennent dans pratiquement tous les processus cellulaires incluant la transcription, la traduction, la réplication et la réparation de l'ADN, le trafic intracellulaire, le transport membranaire, la signalisation cellulaire etc. (Milner-White *et al.*, 1991; Saraste *et al.*, 1990 ; Vetter et Wittinghofer, 1999)

Structuralement, le repliement caractéristique des NTPases à P-loop est constitué d'au moins 5 unités  $\alpha/\beta$  où les brins  $\beta$  forment un feuillet  $\beta$  central, la plupart du temps parallèle, bordé par les hélices  $\alpha$ , adoptant ainsi une forme globulaire, issu d'un noyau structural hérité d'un ancêtre commun (Milner-White *et al.*, 1991). On note également, au sein de leurs séquences, deux motifs conservés mis en évidence par Walker, en 1982, en analysant les séquences de protéines connues pour lier l'ATP comme la myosine, la phosphofructokinase, l'adénylate kinase, l'ADP/ATP translocase, l'ATP synthase (Walker *et al.*, 1982). Ces motifs ont, dès lors, été nommés motifs A et B de Walker.

Le motif A de Walker, de séquence  $GX_4GKT/S$ , où X est un acide aminé quelconque, est situé dans une boucle entre le premier brin  $\beta$  et la première hélice  $\alpha$ . Il est impliqué dans la fixation du nucléotide au niveau du triphosphate, d'où son nom de P-loop. Certaines analyses proposent que les 4 acides aminés quelconques ainsi que la structure de la boucle puissent également jouer un rôle dans la fixation du nucléotide (Ramakrishnan *et al.*, 2002)

Le motif B de Walker est, quant à lui, constitué d'un aspartate conservé (plus rarement un glutamate) précédé de 4 acides aminés hydrophobes (hhhhD). Il se situe, généralement, à la fin du 3<sup>e</sup> brin  $\beta$ . L'aspartate est très conservé et impliqué dans la fixation d'un ion magnésium chélatant le nucléotide (Walker *et al.*, 1982)

Une analyse plus précise des NTPases à P-loop permet de distinguer au moins 7 familles :

- ⇒ Rec A, F1/F0 ATPases et assimilées,
- ⇒ AAA+ ATPases,
- ⇒ MJ/PH/NACHT ATPases,
- ⇒ ABC,

- ⇒ PilT,
- ⇒ Kinases de petites molécules,
- ⇒ GTPases,

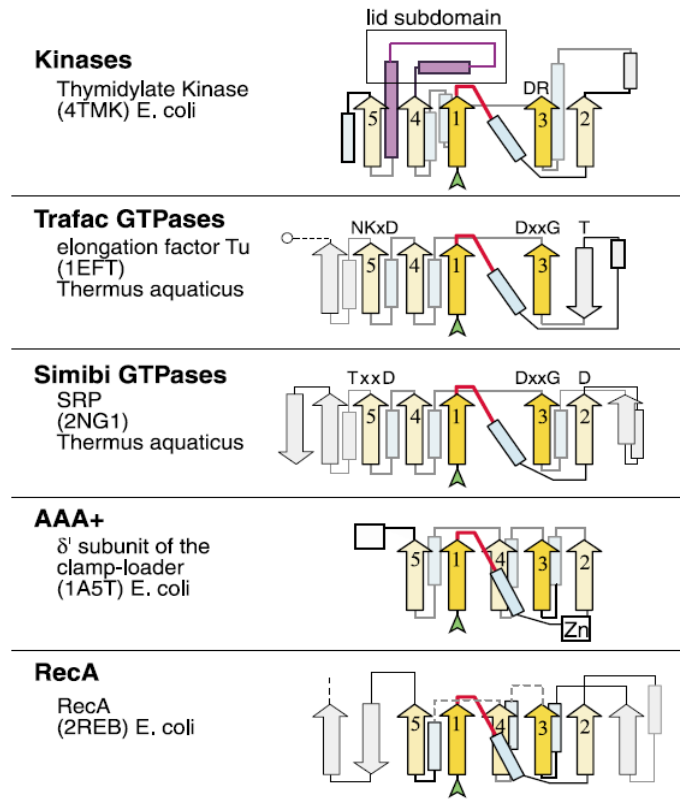
Ces 7 familles peuvent être rassemblées dans deux grands groupes sur des bases de similarités structurales. Le premier groupe, nommé ASCE (pour Additional Strand Catalytic E) rassemble les familles RecA, F1/F0 ATPase, les AAA+ ATPases, les MJ/PH/NACHT ATPases, les protéines de type ABC (ATP Binding Cassette), les protéines de la famille PilT. Dans ce groupe, les protéines présentent un résidu acide très conservé (le plus souvent un glutamate) nécessaire à l'hydrolyse du nucléotide (le plus souvent un ATP). Ce résidu acide réquisitionne une molécule d'eau pour exercer l'attaque nucléophile au niveau de la liaison entre le phosphate  $\beta$  et le phosphate  $\gamma$  du nucléotide (Leipe *et al.*, 2003)

Le second groupe, dont nous parlerons plus en détail, nommé KG (pour Kinase-GTPase) regroupe, comme son nom l'indique, les kinases et les GTPases (Leipe *et al.*, 2002).

## 1-2 Le groupe KG

Dans ces deux familles, le brin  $\beta$  précédant la P-loop et le brin portant le motif B de Walker sont adjacents dans la structure et l'organisation globale du feuillet  $\beta$  est similaire (Leipe *et al.*, 2003). Cependant, les deux familles présentent des différences notables.





**Figure 1** : topologies des différentes familles de NTPases montrant l'organisation du feuillet  $\beta$  central et le module LID complémentaire présent chez les kinases. Les brins  $\beta$  sont représentés par des flèches et numérotés dans l'ordre de leur apparition dans la séquence, les hélices  $\alpha$  sont représentées par des rectangles. D'après (Leipe *et al.*, 2002).

### 1-2-a Les kinases

Les kinases sont des enzymes ubiquistes qui transfèrent le phosphate  $\gamma$  de l'ATP vers un large panel de substrats allant des nucléotides et autres petites molécules aux acides nucléiques et protéines. La fonction kinases est retrouvée chez des protéines appartenant à différentes familles : Rossman, P-loop, Rnase H, etc.

Les Kinases à P-loop montrent généralement un motif A de Walker très conservé, à l'exception de quelques sous-familles qui portent une glycine ou un aspartate à la place de la sérine / thréonine conservée.

Le motif B de Walker, en revanche, présente plus de variation et un glutamate est souvent retrouvé à la place de l'aspartate et on trouve parfois un motif B dépourvu de groupement carboxylate.

Structuralement, les kinases se distinguent des GTPases principalement par la présence d'un module ou domaine complémentaire appelé domaine LID (cf. Figure 1). Ce domaine, principalement constitué d'hélices, est retrouvé entre les brins 4 et 5 et comprend une séquence conservée :  $RX_{(2-3)}R$  dans la première hélice du domaine. La première arginine conservée de ce domaine interagirait avec la base du nucléotide ATP. La seconde arginine interagit avec le phosphate  $\gamma$  du nucléotide. Il stabiliserait l'état de transition en neutralisant la charge négative qui se forme au niveau de l'atome d'oxygène situé entre les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  (Leipe *et al.*, 2003)

### 1-2-b Les GTPases

Les GTPases, protéines liant et hydrolysant le GTP, jouent un rôle prépondérant dans les cellules. Elles interviennent dans pratiquement tous les mécanismes cellulaires. Considérées comme de véritables interrupteurs moléculaires, elles oscillent entre trois états distincts : un état vide très transitoire, un état actif (GTP lié) et un état inactif (GDP lié) (cf. Figure 2). La fixation du GTP engendre des changements conformationnels permettant l'interaction avec les effecteurs. L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne l'enzyme dans un état inactif. Une fois le GDP relargué, la protéine peut entrer dans un nouveau cycle. Les petites protéines G ont souvent une activité hydrolytique faible et forment un complexe stable avec leur substrat et le produit de la réaction d'hydrolyse (Sprang, 1997).

Pour les aider dans leur cycle catalytique, elle interagissent avec des partenaires qui régulent leur activité : les GAP (GTPase activating protein) aident à l'hydrolyse du GTP en GDP ; les GEF (guanine exchange factor) aident au relargage du GDP lié à la protéine facilitant ainsi la fixation du GTP (Geyer et Wittinghofer, 1997; Vetter et Wittinghofer, 2001) qui est plus abondant dans la cellule (Bennett *et al.*, 2009). On trouve également des inhibiteurs du relargage du GDP, appelés GDI, qui bloquent la protéine dans un état GDP lié, inactif.

Tous ces partenaires, chargés de réguler l'activité des GTPases, sont eux même régulés dans la cellule amenant un niveau de contrôle supplémentaire des mécanismes dans lesquels les GTPases sont impliquées.

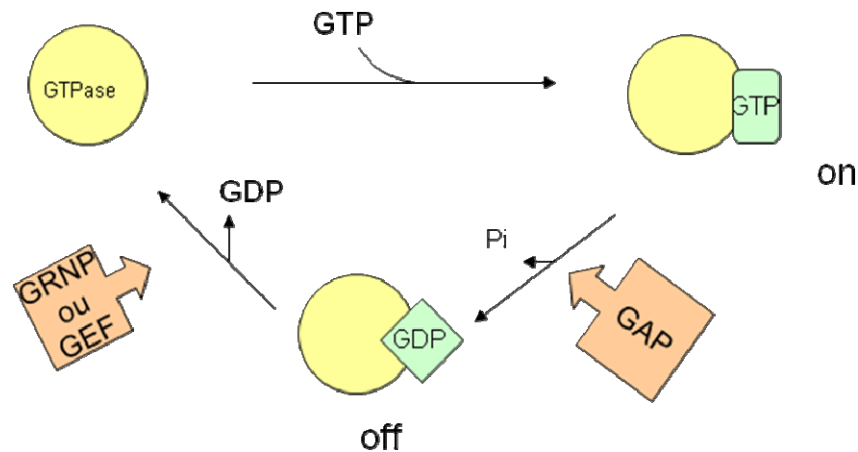


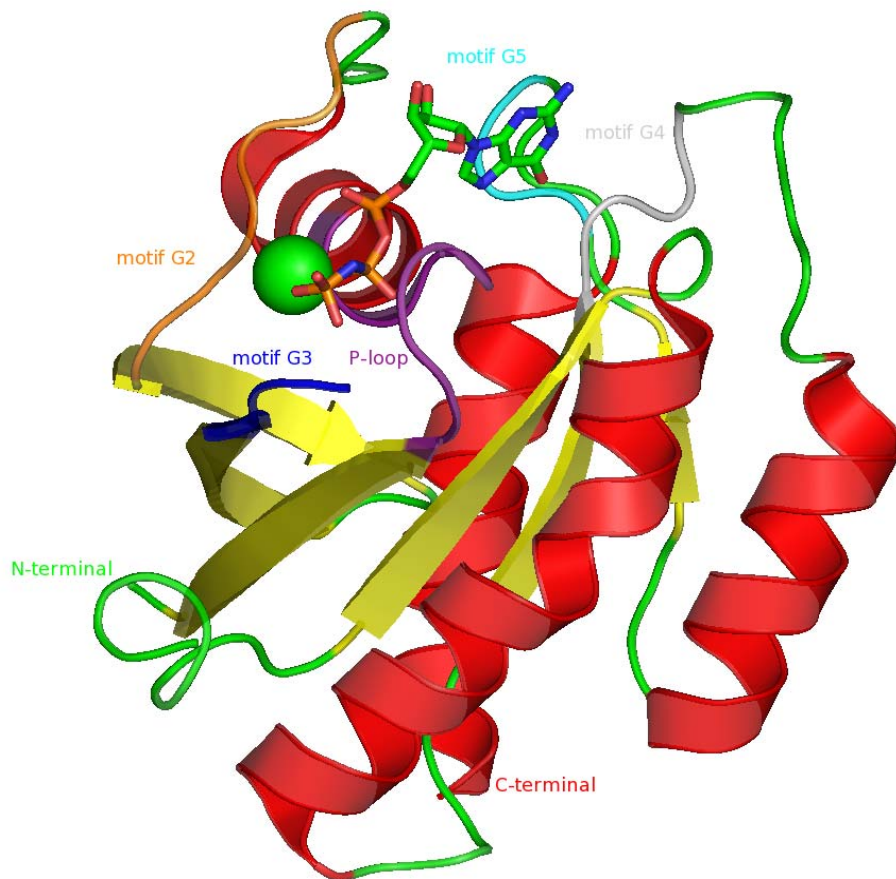
Figure 2 : cycle des GTPases.

### 1-3 Structure des GTPases

Malgré la diversité des fonctions assumées par les membres de cette famille protéique, les GTPases partagent un repliement commun. Cette similarité structurale s'appuie sur une identité de séquence significative suggérant une origine commune (Leipe *et al.*, 2002; Sprang, 1997). Le cœur structural du domaine GTPase (domaine G) est composé d'au moins 7 brins  $\beta$ , formant un feuillet  $\beta$  central parallèle encadré par les hélices  $\alpha$  (Leipe *et al.*, 2002). Cette configuration minimale du domaine G est représentée par la protéine Ras qui est considérée comme modèle (cf. Figure 3). Les GTPases peuvent cependant posséder un ou plusieurs domaines N-terminal ou C-terminal supplémentaires.

Au niveau de la structure primaire, les GTPases se distinguent des autres représentants des protéines à P-loop par un motif B de Walker spécifique. En effet, dans cette famille, ce motif (aussi nommé motif G3) prend la forme hhhhDXXG ou h est un acide aminé hydrophobe et X un acide aminé quelconque. La glycine conservée forme une liaison Hydrogène avec un oxygène du phosphate  $\gamma$  du nucléotide.

Elles présentent également un motif G4, de séquence N/TKXD, absent chez les autres membres des NTPases à P-loop, et responsable de la spécificité des GTPases pour les nucléotides à base guanine.



**Figure 3 : structure de Ras-** Cette structure représente le domaine minimal de fixation du GTP, coloré selon les structures secondaires, hélice  $\alpha$  en rouge feuillet  $\beta$  en jaune et boucle en vert. D'après le fichier pdb 2RGE, réalisé avec Pymol (Delano scientific. Le motif G1 apparait en violet, le motif G2 ainsi que la boucle correspondant au switch I sont représentés en orange, le motif G3 est représenté en bleu, la région suivant le motif G3 et correspondant au switch 2 n'est pas résolu dans la structure. Le motif G4 est représenté en gris et le motif G5 en cyan. Le GMPPNP est représenté en bâtonnets colorés selon l'élément chimique et le magnésium est représenté par une sphère verte.

Quatre à cinq motifs sont ainsi retrouvés chez les GTPases, nommés G1 à G5 dans l'ordre de leur apparition dans la séquence protéique à partir de l'extrémité N-terminale.

Le motif G1 correspond au motif A de Walker cité précédemment :  $GX_4GKT/S$  est situé dans la boucle suivant le 1<sup>er</sup> brin  $\beta$  et précédant la première hélice  $\alpha$ . Ce motif est impliqué dans la

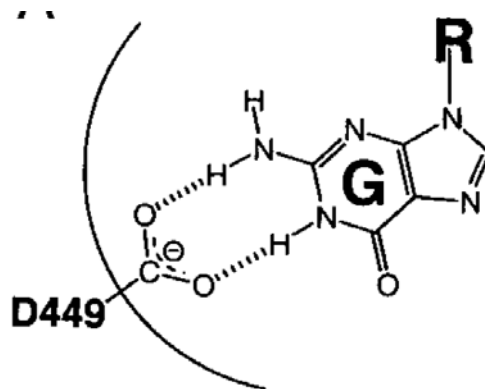
fixation des phosphates du nucléotide via le groupement amide de la chaîne principale ainsi que le groupement amine de la lysine conservée du motif. (Bourne *et al.*, 1991)

Le motif G2 est très conservé pour une famille de GTPase donnée mais pas entre les différentes familles de GTPases. Il est donc difficile d'identifier ce motif. Toutefois, une thréonine, généralement conservée, est souvent trouvée en N-terminal du 2<sup>e</sup> brin  $\beta$  et jouerait un rôle dans l'orientation de la boucle qui porte le motif 2.

Ce motif interviendrait dans la coordination de l'ion magnésium catalytique mais également dans l'interaction avec les effecteurs.

Le motif G3, correspond au motif B de Walker. Chez les GTPases, ce motif B adopte une forme particulière qui n'est pas retrouvée chez les autres NTPases à P-loop : hhhhDXXG. L'aspartate (D) conservé intervient dans la fixation du magnésium catalytique via une molécule d'eau. La glycine conservée forme une liaison hydrogène avec un oxygène du phosphate  $\gamma$  du nucléotide triphosphate situé dans le site catalytique de la protéine.

Le motif G4 : N/TKXD apparaît dans une boucle à la fin d'un brin  $\beta$  souvent hydrophobe (souvent le 6<sup>e</sup> brin). Ce motif est impliqué dans la stabilisation de la base du nucléotide et confère la spécificité des GTPases pour la guanine. Le groupement carboxylique de l'aspartate interagit avec le groupement amine de la base (cf. Figure 4) et les protons du groupement amide de l'asparagine et de la lysine conservée stabilisent le site de fixation du nucléotide en interagissant avec les acides aminés de la région G1.



**Figure 4 : schéma d'interaction de l'aspartate conservé du motif G4 avec la base guanine du nucléotide. D'après (Shan and Walter 2003). Le résidu D449 correspond à l'aspartate du motif 4 de FtsY.**

Enfin, le motif G5, de séquence SAL/K n'est pas présent chez toutes les GTPases et apparaît dans une boucle autour du 7<sup>e</sup> brin  $\beta$  (Bourne *et al.*, 1991). Il étaye la reconnaissance de la base guanine via une liaison hydrogène qui stabilise l'aspartate et l'asparagine du motif G4 (Bourne *et al.*, 1991; Sprang, 1997)

Les GTPases peuvent être réparties en deux grands groupes : les TRAFAC pour « Translation Factor » et les SIMIBI pour « Signal recognition particle MinD BioD ».

### 1-3-a Les GTPases SIMIBI

Structuralement, cette classe de GTPase est principalement caractérisée par son feuillet  $\beta$  central totalement parallèle. En effet, contrairement aux GTPases de la classe TRAFAC, le brin situé en N-terminal par rapport au brin portant le motif B de Walker est toujours parallèle à ce dernier.

Elles présentent également un résidu aspartate conservé en C-terminal du brin 2 qui serait impliqué dans une liaison directe ou faisant intervenir une molécule d'eau avec l'ion magnésium catalytique. Un autre résidu aspartate semble conservé. Il est situé au début du brin portant le motif B de Walker. Il pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de ce brin.

Au niveau de la séquence, on constate des petites différences avec l'autre classe de GTPases ; Le motif A de Walker présente une glycine conservée supplémentaire. Ainsi, la séquence consensus retrouvée chez les SIMIBI est GXXGXGKT/S. Une autre divergence de cette famille touche le motif B de Walker, où l'aspartate est souvent remplacé par un glutamate. Enfin, le motif 4 montre une grande variation dans cette famille, entraînant une moins bonne spécificité pour le GTP des protéines de cette classe.

Les GTPases SIMIBI fonctionnent, la plupart du temps, sous forme de dimères alors que les GTPases de la classe TRAFAC agissent plus souvent sous forme monomérique ou sous des formes multimériques plus importantes.

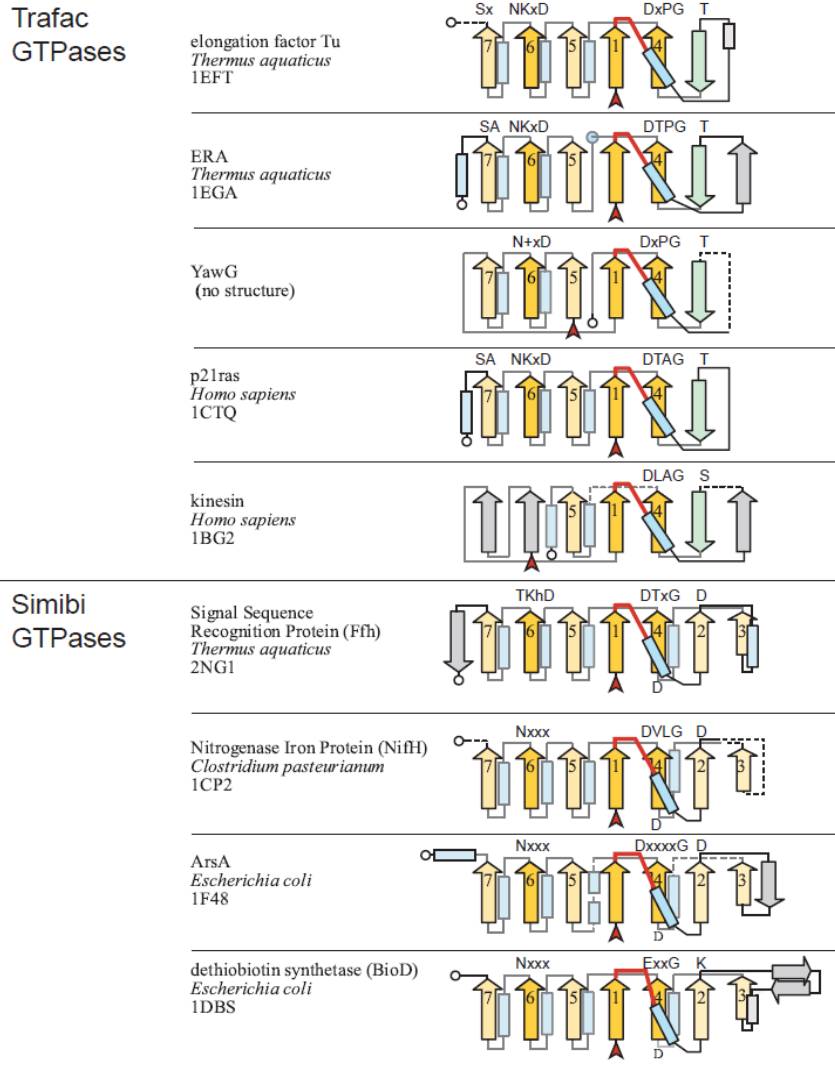
### 1-3-b Les GTPases TRAFAC

Les GTPases TRAFAC sont essentiellement caractérisées par une thréonine ou une sérine conservée dans la boucle située entre les brins 2 et 3. Ce résidu forme une liaison avec le magnésium catalytique.

La majorité de ces GTPases possède également une sérine conservée dans le brin 7 qui serait impliquée dans l'interaction avec la base guanine (motif G5).

Cette famille de GTPase présente la particularité structurale d'avoir le brin flanquant le brin portant le motif B de Walker antiparallèle au reste du feuillet  $\beta$ , contrairement aux GTPases de la famille SIMIBI (cf. Figure 5)

Cette classe de GTPases regroupe la majorité des GTPases les plus connues : les facteurs de transcription, les protéines G hétéro-trimériques, les protéines de la famille Ras, les protéines de la famille de la Dynamine, les Myosines/Kinésines, la famille Obg/HflX et la famille MnmE-EngA-Era-YihA-Septine et assimilées. La majorité des GTPases procaryotes TRAFAC appartiennent à cette dernière (Leipe *et al.*, 2002) et c'est à celle-ci que nous nous intéresserons plus particulièrement.



**Figure 5 : topologies de différentes GTPases - comparaisons des superfamilles TRAFAC et SIMIBI.** Les brins  $\beta$  sont représentés par des flèches et numérotés dans l'ordre de leur apparition dans la séquence, les hélices  $\alpha$  sont représentées par des rectangles La P-loop est représentée en rouge. Tiré de (Leipe *et al.*, 2002).

### 1-4 Mécanisme de fonctionnement

Pour jouer leur rôle, les GTPases effectuent un cycle entre plusieurs états qui leur permettent, ou non, d'interagir avec leurs partenaires cellulaires. Ceci implique des changements de conformation liés à la nature du nucléotide présent dans le site catalytique.

L'étude des différentes structures de GTPases liées au GDP ou à des analogues du GTP a permis de mettre en évidence les régions nécessaires à ce mécanisme « switch ». Les



différences peuvent être subtiles, mais certaines régions montrent des différences conformationnelles importantes selon qu'elles interagissent avec le GDP ou le GTP (Vetter et Wittinghofer, 2001). Ces régions, d'abord mises en évidence chez l'oncogène Ras chez l'homme (Milburn *et al.*, 1990) sont appelées régions Switch I et II. Ce sont des régions flexibles qui impliquent essentiellement des boucles, positionnées à la surface de la molécule.

#### 1-4-a Switch I

Chez Ras, la région switch I implique la 2<sup>e</sup> boucle (résidus 30 à 38), et donc le motif G2, (Milburn *et al.*, 1990; Stouten *et al.*, 1993). Les changements conformationnels observés dans cette région, pour les formes GDP et GTP liées chez Ras, montrent que la chaîne latérale de la thréonine 35 forme une liaison hydrogène avec le phosphate  $\gamma$  du nucléotide (cf. Figure 6) ainsi qu'une coordination avec l'ion magnésium dans la forme nucléotide triphosphate alors que sa chaîne latérale pointe vers le solvant dans la forme GDP lié. De plus, les chaînes latérales des résidus 36 et 38 sont orientées différemment dans les deux structures et la tyrosine 32 réoriente sa chaîne latérale de façon à bloquer partiellement le site de fixation du nucléotide lorsqu'un GTP est présent dans le site. Ces deux conformations pourraient être distinguées par les effecteurs dans la cellule (Milburn *et al.*, 1990). L'étude du mutant T35S de Ras a confirmé l'implication de cette région « Switch » dans l'interaction de Ras avec des effecteurs (Spoerner *et al.*, 2001)

#### 1-4 b Switch II

La région Switch II implique la 4<sup>e</sup> boucle, qui comporte le motif G3, et la 2<sup>e</sup> hélice chez Ras (résidus 60 à 76). Cette région est également très flexible et, chez Ras, cette flexibilité se traduit par une orientation différente de l'hélice 2 dans les différentes structures GDP et GTP lié (Jurnak *et al.*, 1990; Milburn *et al.*, 1990; Stouten *et al.*, 1993). Les chaînes principales des résidus 60 et 61 interagissent avec le phosphate  $\gamma$  du nucléotide induisant une réorganisation de toute la boucle. La conformation de la tyrosine 64 est également affectée par la nature du nucléotide fixé dans le site (Stouten *et al.*, 1993)

La région Switch II serait un site de reconnaissance de régulateurs (GAP, GEF ou GDI) et les changements conformationnels de ce domaine joueraient un rôle important dans l'échange GDP-GTP. (Milburn *et al.*, 1990; Stouten *et al.*, 1993)

On peut comparer ce mode de fonctionnement à un ressort comprimé qui se détend avec l'hydrolyse du GTP, et permet les mouvements des régions Switchs (cf. Figure 6) (Vetter et Wittinghofer, 2001).

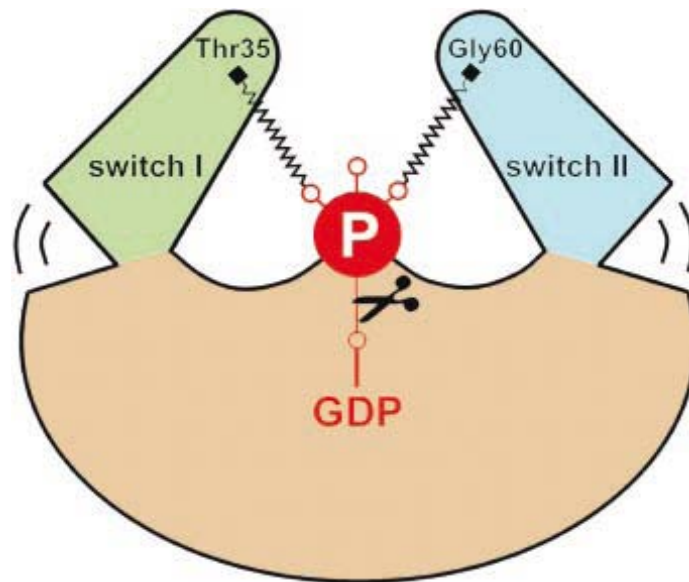
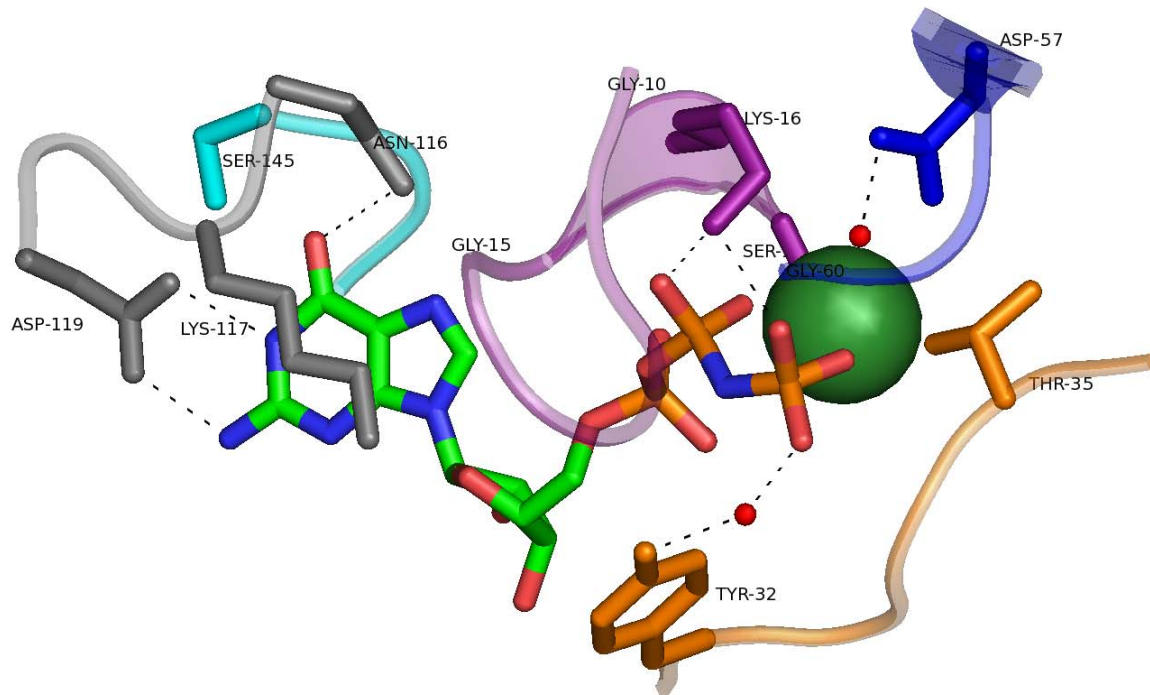


Figure 6 : schéma général de fonctionnement des régions Switch chez les GTPases. D'après (Vetter et Wittinghofer, 2001)

## 1-5 Fixation et hydrolyse du nucléotide

### 1-5-a Fixation

Le GTP se lie au site de fixation sous forme de complexe avec un ion magnésium. Bien qu'il puisse également se fixer en l'absence de ce dernier, l'affinité des GTPases pour le nucléotide est très fortement augmentée en présence d'ion divalent. L'ion magnésium se complexe au nucléotide en formant des liaisons avec un oxygène du phosphate  $\beta$  et un oxygène du phosphate  $\gamma$ . Le magnésium est coordonné 6 fois dans le site nucléotidique. Les autres liaisons stabilisant l'ion sont assurées par le groupement OH de la sérine ou thréonine conservée de la P-loop, ainsi que celui de la thréonine conservée du motif 2. Une autre liaison est assurée par l'aspartate conservé du motif 3 via une molécule d' $H_2O$ , la 6<sup>e</sup> liaison étant également assurée par une molécule d'eau dans le site (Sprang, 1997).



**Figure 7 : fixation du nucléotide chez Ras.** La P-loop est représentée en violet, le switch I en orange, le motif 3 en bleu (le « switch II » n'est pas totalement résolu dans la structure), le motif 4 en gris et le motif 5 en cyan. Les chaînes latérales des résidus conservés sont représentées et les interactions (liaisons H) qu'elles forment avec l'analogue du GTP (le GMPPNP) sont représentées par des pointillés noirs. Le magnésium est représenté sous forme de sphère rouge et les molécules d'eau intervenant dans les liaisons sont représentées par des petites sphères vertes. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol (Delano Scientific) (fichier pdb 2RGE).

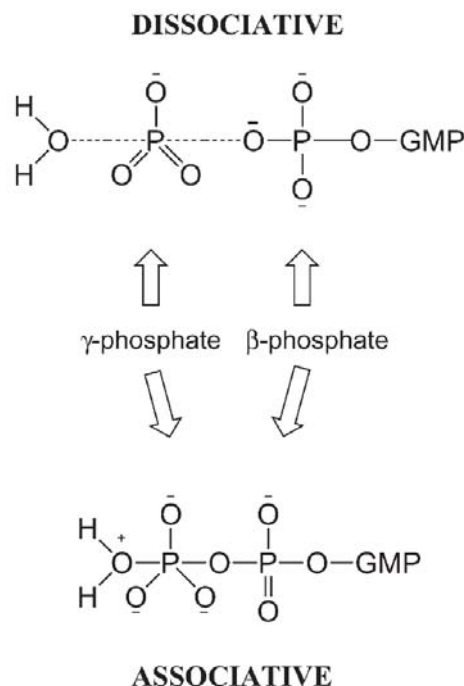
Les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  sont pris en charge par la P-loop (motif G1) mais le phosphate  $\alpha$  ne forme qu'une ou deux liaisons H, ce qui explique la faible affinité des protéines G pour le GMP. Chez Ras, la tyrosine 32 du switch I forme également une liaison avec le phosphate  $\gamma$ .

Enfin, la base du nucléotide est maintenue en place par les liaisons formées entre l'aspartate et l'asparagine du motif 4 (NKXD) et le cycle purique de la base. La lysine conservée de ce motif forme également des liaisons hydrophobes avec la base (cf. Figure 7). Une fois le nucléotide correctement positionné et stabilisé dans le site, l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  peut avoir lieu. Cette hydrolyse utilise une molécule d' $H_2O$  correctement positionnée pour une attaque nucléophile, dite « en ligne » grâce à des interactions à la fois avec un oxygène du phosphate  $\gamma$  et avec la thréonine conservée du motif 2.

1-5-b Hydrolyse

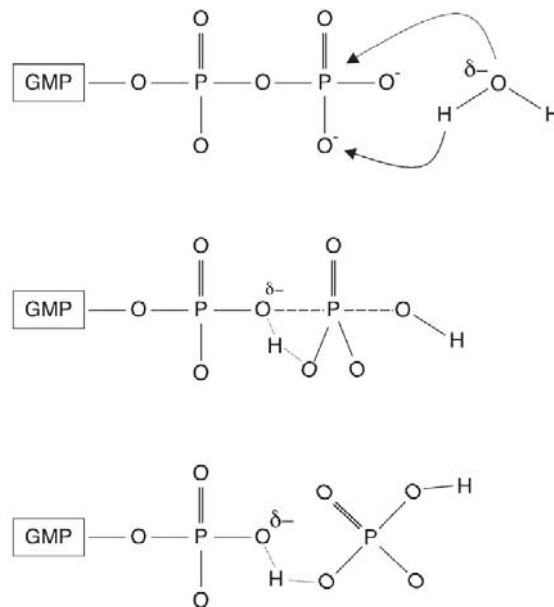
La réaction d'hydrolyse, comme toute réaction chimique, nécessite le franchissement d'une barrière énergétique : l'état de transition. Le pouvoir catalytique des GTPases réside dans leur capacité à stabiliser cet état de transition et donc à abaisser cette barrière énergétique.

Il existe une multitude d'états de transitions possibles pour l'hydrolyse du GTP, allant d'un état de transition dissociatif total à un état complètement associatif. Le modèle dissociatif utilise un intermédiaire métaphosphate qui provoque la rupture de la liaison entre les phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  du nucléotide. Les charges négatives s'accumulent alors sur les atomes formant le pont entre les deux phosphates. Dans le modèle associatif, l'état de transition est représenté par un intermédiaire pentacovalent provoqué par la formation de liaisons entre la molécule d'eau et le phosphate  $\gamma$ , accumulant les charges négatives sur les atomes non pontant du nucléotide (Li et Zhang, 2004) (cf. Figure 8).



**Figure 8 : modèles dissociatif et associatif des états de transition. Dans le modèle dissociatif les charges négatives sont reportées sur le phosphate  $\beta$  et la liaison  $\beta$ - $\gamma$  est rompue. Dans le modèle associatif, la molécule d'eau forme une liaison avec le phosphate  $\gamma$  et les charges négatives sont reportées sur les atomes d'oxygènes non pontant du phosphate  $\gamma$  et ne provoque pas la rupture de la liaison  $\beta$ - $\gamma$ . D'après (Li et Zhang, 2004)**

Au départ, les modèles proposés s'apparentaient plutôt au modèle associatif (Li et Zhang, 2004; Sprang, 1997) mais plusieurs études ont apporté des éléments de réponse allant plutôt en faveur d'un modèle dissociatif (Allin et Gerwert, 2001; Cepus *et al.*, 1998; Maegley *et al.*, 1996) relançant le débat sur la nature de l'état de transition intervenant dans l'hydrolyse du GTP catalysée par les GTPases. Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence une base qui permettrait d'extraire le proton de la molécule d'eau et favoriser ainsi la formation de la liaison entre le phosphate  $\gamma$  et la molécule d'eau nucléophile. Chez Ras, cette molécule d'eau serait activée par la glutamine 61 et la chaîne carbonée de la thréonine 35 (Pai *et al.*, 1990). Cependant, la glutamine ne semble pas être une bonne base pour cette activation et un modèle de catalyse assistée par le substrat a été proposé où le phosphate  $\gamma$  serait la base (Pasqualato et Cherfils, 2005; Schweins et Wittinghofer, 1994) (cf. Figure 9).



**Figure 9: schéma d'hydrolyse du GTP. Modèle d'hydrolyse assisté par le substrat. D'après (Pasqualato et Cherfils, 2005).**

La mutation de cette glutamine chez Ras entraîne une diminution de l'activité d'hydrolyse du GTP intrinsèque de la protéine (Der *et al.*, 1986) et diminue également l'hydrolyse du GTP stimulée par les GAP (Resat *et al.*, 2001).

Toutefois, chez certaines GTPases, cette glutamine est absente et remplacée par un acide aminé hydrophobe. Ces GTPases, appelées HAS-GTPases (pour Hydrophobic Amino acid Substitution–GTPase) présenteraient un mécanisme d'hydrolyse différent. En effet, la charge positive fournie par la glutamine chez Ras serait amenée soit par un autre acide aminé dans la structure (en *cis*) soit en *trans*, par un partenaire. Dans tous les cas, l'acide aminé hydrophobe remplaçant la glutamine catalytique pointe dans la direction opposée au site catalytique et n'interviendrait donc pas dans l'hydrolyse ou ne s'alignerait pas avec l'arginine provenant des GAP. Cette conformation présentant l'acide aminé remplaçant la glutamine catalytique à l'opposé du site catalytique a été appelée « conformation rétractée » (elle est appelée conformation active lorsque le résidu pointe en direction du site catalytique) (Mishra *et al.*, 2005). De plus, cet acide aminé hydrophobe est souvent trouvé en interaction avec d'autres acides aminés hydrophobes présent dans son environnement proche (Mishra *et al.*, 2005).

### 1-5 GAP, GEF et effecteurs

Comme nous l'avons vu précédemment, le cycle catalytique des GTPases fait intervenir bon nombre de partenaires, qui régulent et aident à l'activité et au rôle des GTPases. Les facteurs d'échange de nucléotide (GEF) interagissent avec les régions « Switch » et favorisent le relargage du GDP lié au site en introduisant un résidu à proximité de la P-loop et de la région de fixation du magnésium. Ce résidu supplémentaire va induire des changements structuraux locaux qui vont perturber la fixation des phosphates et diminuer ainsi l'affinité pour le GDP. Le GTP étant plus abondant dans la cellule que le GDP, il va pouvoir se fixer d'autant plus facilement (Vetter et Wittinghofer, 2001). Cependant, ce modèle dit de substitution, a été discuté récemment et un modèle dit de déplacement a été proposé, émettant l'hypothèse d'un complexe quaternaire GEF-RasGDP-GTP (Zhang *et al.*, 2005).

Les protéines activatrices des GTPases (GAP) interviennent directement dans la catalyse en amenant un résidu chargé supplémentaire généralement une arginine, dans le site catalytique. Cette arginine catalytique aiderait à l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  du nucléotide, en agissant de concert avec la glutamine catalytique chez les GTPases de la famille de Ras et Rho. Chez les protéines G-hétérotrimériques, cette arginine existerait de façon intrinsèque dans la protéine G

et jouerait le même rôle que l'arginine amenée par une GAP. Cette arginine jouerait aussi un rôle dans la stabilisation de l'état de transition (Vetter et Wittinghofer, 2001).

Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'action. Par exemple, chez RanGAP (GAP de la protéine Ran) cette arginine n'existe pas et est remplacée par une tyrosine (Seewald *et al.*, 2002).

Chez les GTPases de type Rab, la glutamine suivant le motif B de Walker (glutamine 61 chez Ras) est présente mais n'intervient pas dans la stabilisation de l'état de transition. En effet, ce résidu établirait des interactions avec la chaîne principale d'une tyrosine et le groupement amine d'une glutamine de Gyp1p, une protéine GAP de la famille Rab. La conformation ainsi adoptée permettrait à la GAP de fournir une glutamine en trans qui jouerait le rôle de la glutamine catalytique (Pan *et al.*, 2006).

Chez les Rap GTPases, la glutamine catalytique est remplacée par une thréonine qui semble nécessaire à l'activité GTPase intrinsèque de la protéine. Rap1GAP ne posséderait pas de doigt arginine mais présenterait, à la place, un « pouce asparagine » pour stabiliser l'état de transition (Chakrabarti *et al.*, 2007).

De plus, chez les HAS-GTPases, la glutamine catalytique n'existant pas, le mode d'action serait différent.

Les effecteurs sont définis par leur meilleure affinité pour la forme GTP lié de la protéine G par rapport à la forme GDP lié. Les mécanismes d'interactions sont variés et différent selon le type d'effecteur et la famille de GTPase considérée. La durée de vie de ce complexe protéine G-effecteur est dépendante de l'activité hydrolytique de la protéine.

Il existe une autre classe de partenaire régulant le cycle catalytique des GTPase : les GDI (pour GTP binding Domain Inhibitor). Ils empêchent le relargage du GDP et bloqueraient ainsi la GTPase en mode inactif. Cette classe de partenaire a été décrite seulement pour les GTPases de la famille Ras/Rho/Rac et ne sera pas développée ici.

### **1-6 Un exemple de GTPase TRAFAC bactérienne : Era**

Era est une protéine de 34 kDa qui a été étudiée pour la première fois à la fin des années 1980. Décrite comme un homologue de Ras de *S. cerevisiae* chez *E. coli* (dans sa partie N-terminale), elle est alors baptisée Era pour « *E. coli* Ras-like protein ». Comme Ras,

elle est capable de fixer du GTP (Ahnn *et al.*, 1986). Cette homologie a ensuite été rediscutée (Inada *et al.*, 1989) ; (Chen *et al.*, 1990b) et Era est aujourd'hui distinguée des GTPases de la famille Ras et appartient à une famille distincte de GTPases (Leipe *et al.*, 2002) ; (Mittenhuber, 2001). Des homologues de Era ont par ailleurs été trouvés chez les eucaryotes (Akiyama *et al.*, 2001; Ingram *et al.*, 1998).

Le gène *era* fait partie de l'opéron *rnc* chez *E. coli* comprenant le gène de la RNase III, impliquée dans la maturation des ARN en amont, et *recO* impliqué dans la réparation de l'ADN en aval (Bardwell *et al.*, 1989; Takiff *et al.*, 1989). L'impossibilité d'isoler un mutant de délétion pour ce gène suggère qu'il est essentiel (Gollop et March, 1991; Inada *et al.*, 1989; Takiff *et al.*, 1989). L'expression d'Era serait régulée par le taux de croissance bactérienne (Britton *et al.*, 1998). Des expériences de déplétion de Era ou encore l'étude de mutations ponctuelles affectant l'activité GTPase de Era ont montré que la croissance bactérienne et la division cellulaire sont affectées (Britton *et al.*, 1997; Gollop et March, 1991). Era a donc été proposée, dans un premier temps, comme intervenant dans la division cellulaire ou la progression du cycle cellulaire.

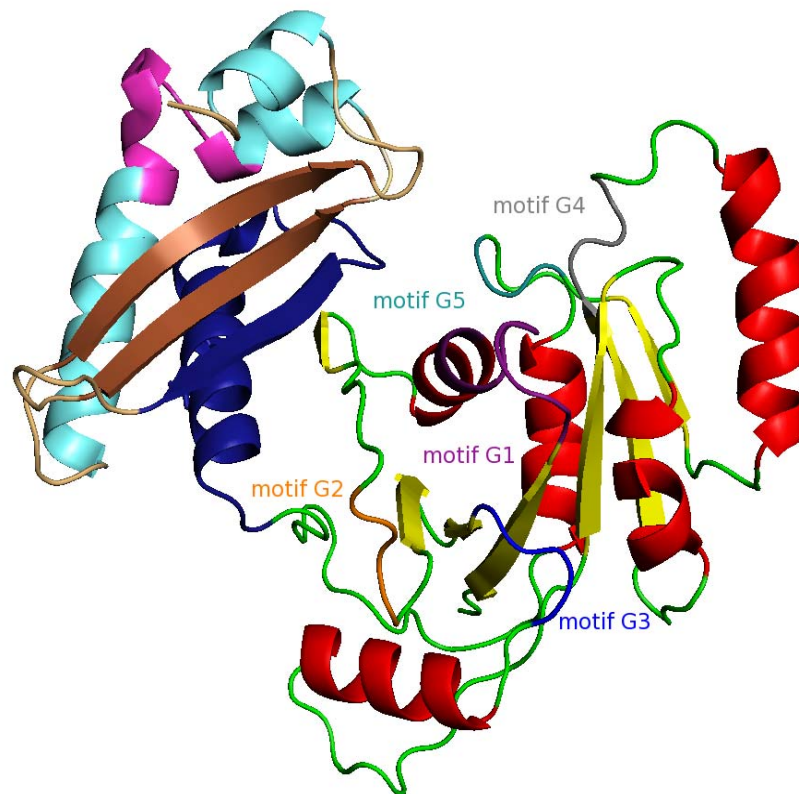
Era possède une activité GTPase faible ( $0,3 \cdot 10^{-3}$  à  $17,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) (Sullivan *et al.*, 2000), importante pour sa fonction *in vivo* et est capable de fixer du GTP et du GDP *in vitro* (Chen *et al.*, 1990b; Shimamoto et Inouye, 1996). Elle a été trouvée associée à la membrane plasmique (Lin *et al.*, 1994) et est capable de s'autophosphoryler dans une région proche du motif G2 (Shimamoto et Inouye, 1996; Sood *et al.*, 1994). La mutation E200K de Era entraîne un phénotype température-dépendant chez *E. coli*. La surexpression de KsgA, une méthyltransférase de l'ARNr 16S, annule ce phénotype. (Lu et Inouye, 1998).

La résolution de la structure 3D de Era (cf. Figure 10) a permis de mettre en évidence la présence de deux domaines dans la protéine : Le domaine G du côté N-terminal similaire à Ras et un domaine C-terminal de type KH (pour « K-Homology » ou « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K homology »), connu pour lier les acides nucléiques et trouvé dans la protéine S3 par exemple (Chen *et al.*, 1999).

Ce domaine présenterait plusieurs repliements autour d'un noyau central  $\beta\alpha\alpha\beta$ , avec un motif Hélice-Tour-Hélice portant le motif consensus VIGXXGXXI (ou x représente un acide aminé quelconque) responsable de l'interaction avec les acides nucléiques. Deux types de domaines KH ont ainsi été décrit : le type I et le type II présentant respectivement des extensions C-terminale et N-terminale. Le domaine KH de type I est représenté par la hnRNP K ou la



vigiline et le domaine KH de type II par Era (avec une extension  $\alpha/\beta$  N-terminale) ou encore la protéine S3. (Grishin, 2001). Ce domaine apparaît normalement en tandem dans les protéines et présente peu d'homologie de séquence.



**Figure 10 : structure 3D de Era.** Le domaine GTPase N-terminal est coloré en fonction des structures secondaires : les hélices  $\alpha$  en rouge, les brins  $\beta$  en jaune et les boucle en vert. Le motif G1 est en violet, le motif G2 en orange, le motif G3 en bleu foncé, le motif G4 en gris et le motif G5 en vert foncé. Le domaine KH C-terminal est également coloré en fonction des structures secondaires : les hélices  $\alpha$  en bleu ciel, les brins  $\beta$  en marron et les boucles en orange pale. L'extension  $\alpha/\beta$  N-terminale est représentée en bleu foncé. Le motif conservé, VIGXXGXXI, est représenté en rose. Fichier PDB 1EGA.

La présence de ce domaine de fixation dans la structure d'Era suggère que cette dernière est capable de se lier à des acides nucléiques ou qu'elle est impliquée dans des interactions protéine-protéine ARN- dépendante. (Chen *et al.*, 1999). Par la suite, il a été montré que Era se lie à l'ARN *in vitro* et que le domaine C-terminal joue un rôle important dans cette interaction (Johnstone *et al.*, 1999). Era a été décrite comme interagissant avec l'ARNr 16S chez *S. pneumoniae* et cette interaction augmente l'activité GTPase d'Era. De plus, cette

interaction se fait via le domaine KH de la protéine. Il en va de même chez *E. coli*. (Hang *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000). Plus précisément, Era de *E. coli* interagit avec la sous-unité 30S du ribosome et la déplétion en Era entraîne une accumulation de sous-unité 30S et 50S au détriment du ribosome 70S. L'interaction avec le ribosome se fait de façon GTP dépendante (Sayed *et al.*, 1999) et une accumulation d'ARNr 17S, précurseur de l'ARNr 16S a été rapportée (Inoue *et al.*, 2003). De plus, la surexpression d'Era restaure le phénotype lié à l'absence de RbfA, une petite protéine impliquée dans la biogenèse de la sous-unité 30S. La structure 3D de cette dernière a révélé une organisation de type KH, similaire au domaine C-terminal de Era (Inoue *et al.*, 2003). Tous ces résultats suggèrent que Era est impliqué dans la maturation de l'ARN 16S et/ou la biogenèse du ribosome et plus particulièrement de la sous-unité 30S (Sharma *et al.*, 2005).

La résolution de la structure 3D de Era en complexe avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, a permis de suggérer un rôle plus précis de Era dans le processus de biogenèse du ribosome. Ainsi, Era agirait comme une chaperonne de l'ARN 16S et serait un point de contrôle pour l'assemblage de la petite sous-unité du ribosome (Tu *et al.*, 2009).

Après 20 ans d'étude de cette protéine, Le rôle exact d'Era dans la cellule se précise mais reste flou par bien des aspects. Era est l'une des GTPases bactérienne les plus étudiées car l'une des premières GTPases procaryote mise en évidence. Comme beaucoup de nouvelles GTPase bactériennes, elle semble jouer un rôle important dans le processus d'assemblage et de maturation du ribosome. Ce processus clé est encore mal compris et la découverte de facteurs associés tels que Era permet d'en préciser le tableau général.

Le ribosome est un acteur majeur dans la vie cellulaire, et comprendre les voies de biogenèse et les mécanismes de fonctionnement de cette particule clé du vivant est devenu un enjeu important. En effet, Le ribosome est la cible de bon nombre d'antibiotiques et le développement des mécanismes de résistance chez les bactéries rendent l'étude de celui-ci d'autant plus important.

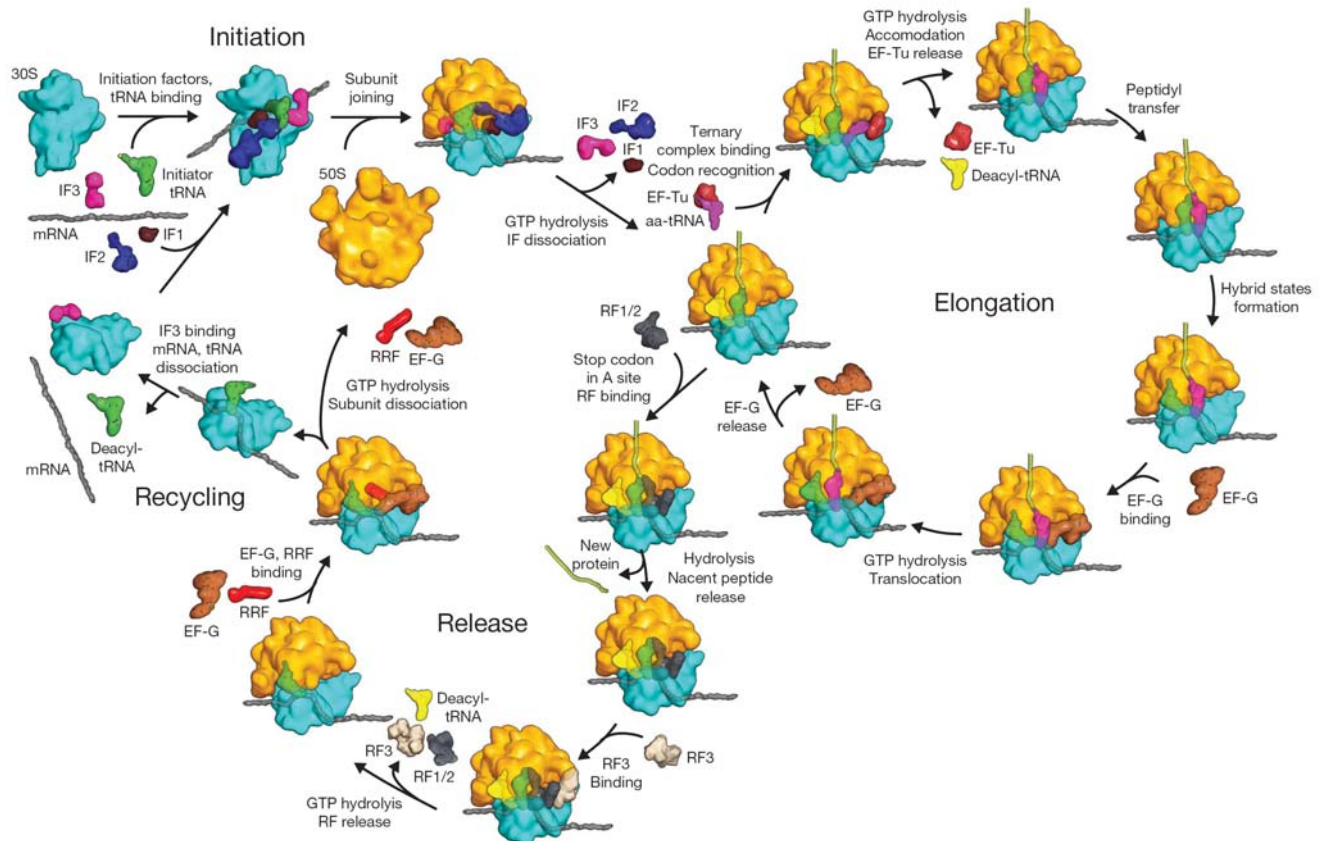
## **2-Ribosomes**

Le ribosome est une particule nucléoprotéique responsable d'un processus clé du vivant : le décodage de l'ARN messager (ARNm) en protéine. La synthèse protéique s'effectue en permanence dans la cellule. Une cellule eucaryote contient plus d'un million de ribosomes et une cellule bactérienne environ 100 000. Il est capable de former plus de 15 liaisons peptidiques par seconde (Bashan et Yonath, 2008).

La formation d'une telle particule nécessite plusieurs étapes complexes. Chacune de ces étapes est étroitement régulée et elles doivent être coordonnées entre elles afin d'éviter des pertes d'énergie et un déséquilibre physiologique dans la cellule. La biogénèse du ribosome, bien que de plus en plus étudiée ces dernières années, reste, elle aussi, floue sur bien des aspects.

### **2-1 Rappel sur la traduction chez les bactéries**

L'initiation de la synthèse protéique est promue par 3 facteurs : IF1, IF2 et IF3. Elle implique la région -6,-10 de l'ARN messager, plus connue sous le nom de séquence de Shine-Dalgarno (SD) et la séquence anti-Shine Dalgarno (anti-SD) situé en 3' de l'ARNr 16S. Après l'association de la sous-unité 30S sur l'ARNm via l'interaction SD/anti-SD, les facteurs d'initiation sont recrutés au niveau du site P (pour site Peptidyl) pour la mise en place du codon d'initiation (cf. Figure 11).



**Figure 11 : schéma de la traduction chez les bactéries.** La sous-unité 30S apparaît en bleu, la sous-unité 50S en jaune. Les facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF 3 apparaissent en marron, bleu et rose respectivement. EF-Tu est représenté en rouge et EF-G en marron clair. D'après (Schmeing et Ramakrishnan, 2009).

La sous-unité 50S vient ensuite s'associer à la sous-unité 30S, terminant ainsi l'étape d'initiation. Le site P (pour peptidyl), comporte alors l'ARNt initiateur et le site A (pour site Aminoacyl) est vide, prêt à recevoir un ARNt portant un acide aminé. Le processus entre alors en phase d'élongation. L'ARNt amino-acylé est amené au site A sous forme d'un complexe ternaire impliquant le facteur d'élongation EF-Tu et du GTP. Après hydrolyse du GTP, EF-Tu relargue l'ARNt situé dans le site A. Les acides aminés situés aux extrémités des ARNt présents dans les sites P et A sont alors positionnés au niveau du Centre Peptidyl Transferase (ou PTC) sur la sous-unité 50S et la liaison peptidique peut ainsi être réalisée. L'ARNt désacylé peut être transféré vers le site E (pour Exit) et être éjecté du ribosome pendant que l'ARNt portant le peptide en formation passe dans le site P, libérant alors le site A. Cette étape de translocation est induite par l'hydrolyse du GTP par EF-G. Le ribosome est alors prêt pour un nouveau cycle d'élongation. Ce cycle se poursuit jusqu'à ce qu'un codon stop

apparaisse au niveau du site A. Ce codon est reconnu par plusieurs facteurs de relargage : RF1 ou RF2 (qui ne reconnaissent pas les même codons). La fixation de ces facteurs déclenche l'hydrolyse et le relargage de la chaîne peptidique. Lorsque la liaison entre le peptide et l'ARNt situé au site P est hydrolysée, RF3 intervient pour dissocier RF1/RF2 du site A.

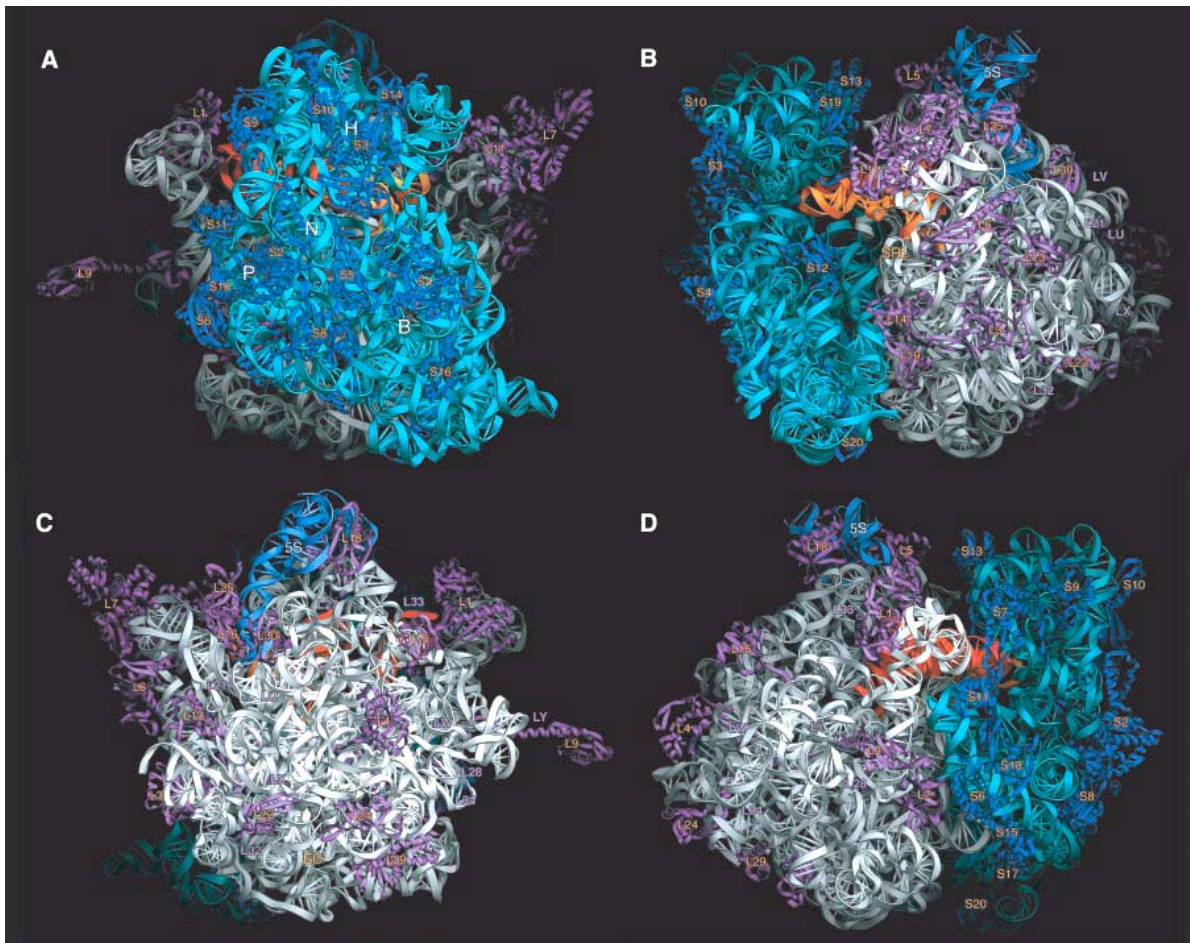
Le ribosome peut alors être recyclé. Des facteurs de recyclages interviennent en partenariat avec EF-G pour dissocier les sous-unités. Simultanément, IF3 remplace l'ARNt désacylé et permet à l'ARNm de se détacher ou de former un nouveau complexe avec le site de fixation du ribosome suivant (RBS) (cf. Figure 11).

## 2-2 Structure du Ribosome

Cette structure macromoléculaire complexe est très conservée au sein du vivant. Elle est composée d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité quel que soit l'organisme considéré. Malgré une ressemblance importante et un rôle essentiel central, il existe des différences majeures importantes entre ribosome eucaryote et ribosome procaryote, non seulement au niveau des protéines qui le composent mais aussi au niveau des ARN ribosomaux (ARNr) et de la voie de biogénèse des particules. Je vais m'intéresser plus particulièrement aux ribosomes bactériens, toutefois les revues de (Kressler *et al.*, 2009; Strunk et Karbstein, 2009), entres autres, peuvent être consultées pour plus de détails concernant les ribosomes eucaryotes.

Le ribosome bactérien est constitué d'une petite sous-unité 30S et d'une grande sous-unité 50S qui s'associent pour former une particule 70S (2,5 MDa). Chacune de ces sous-unités à un rôle défini.

Plusieurs structures de ribosomes, ou de ses sous-unités, ont été résolues par microscopie électronique ou par diffraction des rayons-X et ont permis de réelles avancées dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de cette particule (cf. Figure 12). Les deux sous-unités présentent des ARNr structurés en éléments hélicoïdaux connectés entre eux par des boucles et stabilisés par des interactions hélice-hélice (Ramakrishnan et Moore, 2001).



**Figure 12 : structure 3D du ribosome 70S de *Thermus thermophilus*. La sous-unité 30s est représentée en bleu clair pour l'ARN et en bleu foncé pour les protéines, la sous-unité 50S en blanc pour l'ARN et en violet pour les protéines, les ARNt en orange. Les 4 vues A, B, C et D sont représentées après des rotations de 90°. D'après (Yusupov *et al.*, 2001).**

Ces structures ont permis de montrer que l'interface entre les deux sous-unités ribosomiques ne contient pas ou peu de protéine. Les interactions sont donc assurées majoritairement par les différentes molécules d'ARN qui composent le ribosome. Quelques protéines interviennent dans la stabilisation de cette interaction : S13, S19 et L5 (Schuwirth *et al.*, 2005). Il apparaît que le magnésium joue un rôle important dans la stabilisation de la structure globale du ribosome. 40% des sites de fixation du magnésium interagissant avec les ARNr sont conservés au sein des trois règnes du vivant (Schuwirth *et al.*, 2005).

Les sites fonctionnels sont tous situés à l'interface des deux sous-unités ou sont proches de cette interface.



3 sites sont constitués par les deux sous-unités : les sites A, P et E. Ils permettent à la particule 70S d'accueillir les ARNt correspondant au code génétique, de les positionner correctement afin d'allonger la chaîne peptidique et de les acheminer correctement vers la sortie du ribosome au cours de l'élongation.

Il apparaît que l'activité enzymatique du ribosome est portée essentiellement par l'ARNr, classant le ribosome parmi les ribozymes (Scott, 2007; Steitz, 2008) bien que les protéines jouent tout de même un rôle important dans ces processus, au moins au niveau structural.

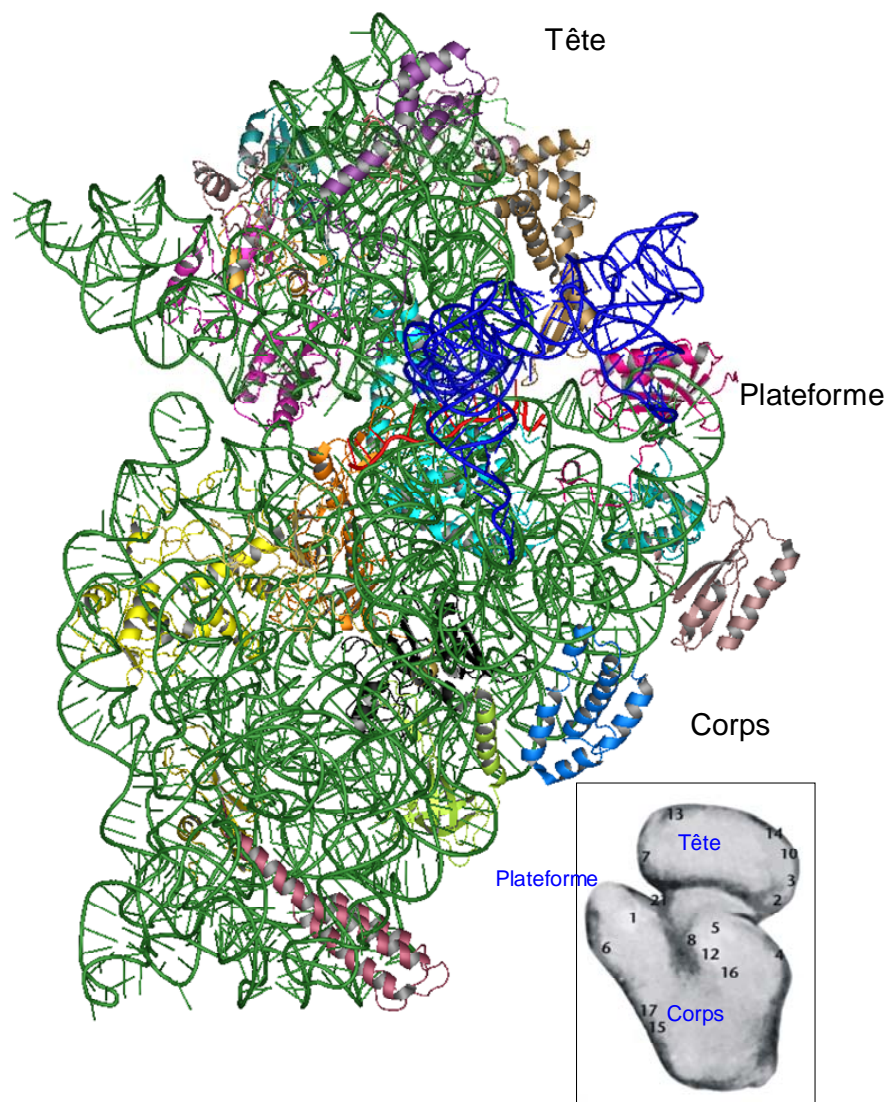
### 2-2-a Sous-unité 30S

Cette sous-unité de 0,85 MDa est constituée d'un ARN 16S de 1542 nucléotides et de 21 protéines notées S1 à S21, S1 étant la plus grande (61 kDa) et S21 la plus petite (8,4 kDa). Toutes ces protéines sont basiques à l'exception de S1, S2 et S6. Leur rôle est essentiellement de stabiliser la structure 3D de la sous-unité, l'architecture globale de l'ARNr et de le protéger des RNases cellulaires.

Les fonctions principales de cette petite sous-unité sont l'initiation de la traduction grâce à l'interaction avec l'ARNm et le décodage de cet ARNm ainsi que le contrôle de la fidélité de traduction. Elle permet l'alignement correct de l'ARNm grâce à l'interaction de la séquence anti-SD située en 3' de l'ARN 16S et dirige la translocation de l'ARNm et de l'ARNt.

La structure de cette sous-unité montre une grande flexibilité. Elle est organisée en trois domaines distincts qui suivent la polarité 5'-3' de l'ARN 16S : la plateforme en 3', la tête au centre et le corps en 5' de l'ARNr 16S (cf. Figure 13). Cette flexibilité est nécessaire à son rôle dans le processus de traduction. En effet, la rotation de la tête jouerait un rôle dans le mouvement des ARNt lors de la translocation, (Schuwirth *et al.*, 2005). Le centre de décodage, quant à lui, est situé au niveau de la partie supérieure du corps et de la partie inférieure de la tête. (Schlueder *et al.*, 2000).

Les sites A et P sont majoritairement composés d'ARN mais des boucles provenant des protéines S9 et S13 complètent les sites de fixation des ARNt.



**Figure 13 : structure de la sous-unité 30S du ribosome. Vu depuis l'interface, on voit que les protéines sont localisées sur l'autre face. Les protéines sont représentées chacune en une couleur différente, l'ARNr est en vert, les ARNt sont représentés en bleu foncé et l'ARNm en rouge. En encadré, la représentation de la sous-unité en cryo-microscopie électronique, vue de la face opposée à l'interface, avec positionnement des protéines (d'après (Frank and Agrawal 2001) et fichier pdb 2WRI.**

### 2-2-b Sous-unité 50S

La grande sous-unité (1,5 MDa) du ribosome est formée par 2 ARN 5S et 23S, de 2904 et 120 nucléotides respectivement, et 34 protéines notées L1 à L34, L2 étant la plus grande (29,7 kDa) et L34 la plus petite (5,2 kDa). Toutes les protéines sont basiques et présentent en un seul exemplaire à l'exception des protéines L7 et L12 qui sont plutôt acides et présentes en 2



exemplaires chacune. L7 et L12 ont la même séquence protéique mais diffèrent par une modification N-terminale post-traductionnelle : L7 est N-acétylée.

De manière globale, la sous-unité 50S est hémisphérique avec une face plate, constituant l'interface avec la sous-unité 30S. Cette face comporte un sillon qui traverse toute la sous-unité, appelé canyon et qui sert à accueillir l'extrémité de l'ARNt et permet la sortie du peptide néo-synthétisé. Elle présente une silhouette en couronne composé de 6 domaines, notés I à VI (cf. Figure 14). Plus complexe que la sous-unité 30S, elle est plus monolithique et moins flexible. On peut distinguer une protubérance formée par la protéine L1, une protubérance centrale composée majoritairement par l'ARN 5S et une tige flexible composé des protéines L7/L12 (2 dimères) (cf. Figure 14).

La sous-unité 50S porte l'activité peptidyl-transférase du ribosome (au niveau du PTC) et l'activité de translocation. Elle fournit également un tunnel de sortie pour le peptide en cours de synthèse (Bashan et Yonath, 2008). Le PTC, situé dans le domaine V et le domaine II, est impliqué dans l'activité GTPase EF-Tu-dépendante du ribosome (Frank et Agrawal, 2001).

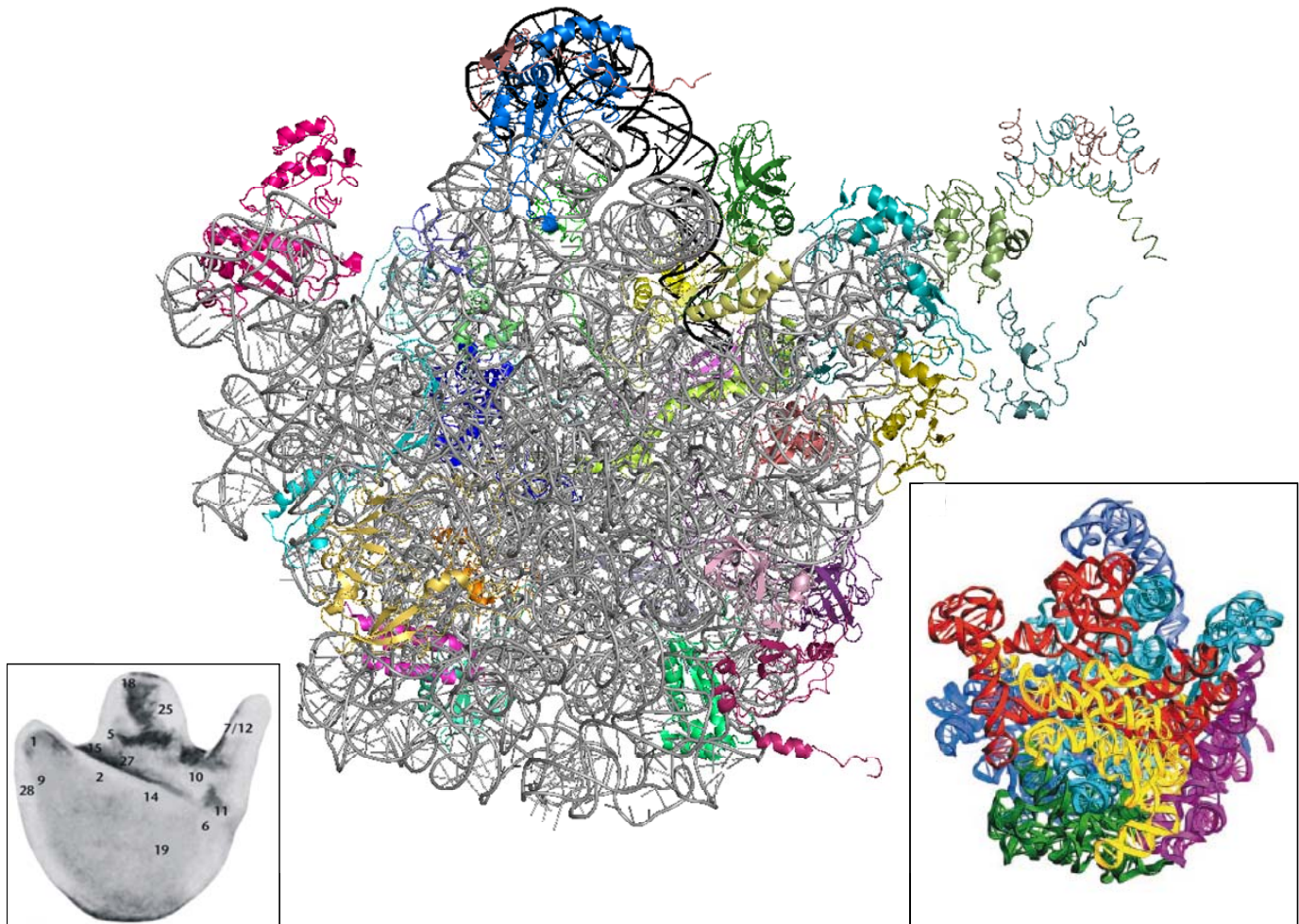


Figure 14 : structure 3D de la sous-unité 50S (fichier pdb 2WRI). Vue de l'interface. L'ARN 23S est représenté en gris, l'ARN 5S en noir, et les protéines de différentes couleurs. Le positionnement d'une partie des protéines est répertorié dans la représentation de la sous-unité vue en microscopie électronique, en encart en bas à gauche (d'après (Frank et Agrawal, 2001)). Les 6 domaines composant la sous-unité 50S sont présentés dans l'encart en bas à droite : le domaine I est représenté en bleu, le domaine II en cyan, le domaine III en vert, le domaine IV en jaune, le domaine V en rouge et le domaine VI en magenta (d'après (Yusupov *et al.*, 2001)).

### 2-3 Biogénèse

L'assemblage et la maturation des sous-unités sont complexes et impliquent des modifications des ARN, la fixation ordonnée des protéines ribosomiques et des ions métalliques.

### 2-3-a Les ARN ribosomaux

Les ARN ribosomaux (ARNr) sont formés à partir d'un seul transcrit qui doit être modifié et clivé pour donner des ARNr matures. Cette maturation commence tôt dans la synthèse des ARN. Pendant la transcription, des structures secondaires apparaissent sur l'ARN néo-synthétisé dévoilant des sites de fixation de protéines. L'ARN peut alors être modifié chimiquement afin de permettre aux différentes endonucléases de jouer leur rôle et de générer les espèces d'ARNr matures. La première endonucléase qui intervient est la RNase III, qui sépare les ARN précurseurs et les ARNt. Les ARN ainsi créés sont les précurseurs de l'ARNr 16S (17S), le précurseur du 5S (9S) et celui du 23S.

L'ARNr 16S mature est généré par 3 enzymes distinctes : la RNase E, la RNase G et une RNase non caractérisée. Les 2 premières vont couper les nucléotides en trop du côté 5' et ceux du côté 3' sont ôtés par la nucléase non identifiée (Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007). La maturation de l'ARNr 23S dépend complètement de la RNase III. Les maturations des extrémités sont, quant à elles, prises en charge par la RNase T d'une part et une RNase non identifiée d'autre part.

Les ARNt et l'ARN 5S sont maturés par la RNase P, la RNase T, la RNase E et une RNase non identifiée.

Tous ces ARNs sont modifiés de façon covalente durant le processus de maturation au niveau de la base ou du ribose. Ces modifications vont de l'isomérisation (uridine vers pseudouridine) à l'ajout de groupements chimiques tels que méthyle, carbamyle, thiol, amine...

L'ARN 16S comporte ainsi 11 modifications (10 méthylations et 1 pseudouridine), l'ARNr 23S comporte 25 modifications (14 méthylations, 9 isomérisations, 1 pseudouridine méthylée, et une modification non caractérisée). La majorité de ces modifications sont retrouvées dans la région de décodage et au niveau du PTC.

Certaines modifications ont lieu sur l'ARN nu quand d'autres interviennent sur la particule en formation. Cependant, la sous-unité 30S peut être formée sans les modifications de l'ARN 16S. La sous-unité 50S est plus dépendante de ces modifications mais toutes les modifications de l'ARN 23S ne sont pas essentielles à la formation de la particule 50S. Seules 7 d'entre elles sont indispensables pour une reconstitution *in vitro* (Green et Noller, 1996). Elles sont

surtout localisées dans le PTC et l'assemblage du 50S requiert la présence de 3 pseudouridines dans l'hélice 69 et de l'uridine méthylée en position 2552. La méthylation de cette dernière est assurée par la protéine RrmJ. La délétion de ce gène entraîne un défaut de croissance sévère qui peut être restaurée par la surexpression de 2 GTPases : Obg et EngA (Tan *et al.*, 2002).

La plupart des nucléotides modifiés sont très conservés, mais leur fonction est mal comprise et bon nombre d'entre eux sont localisés autour des sites fonctionnels du ribosome. Certaines de ces modifications pourraient être impliquées dans les mécanismes de résistances aux antibiotiques (Connolly et Culver, 2009). Ces modifications pourraient apporter une voie de contrôle supplémentaire dans le repliement de l'ARNr et l'interaction avec les protéines, peut être pour faciliter l'assemblage de la particule. Peut-être jouent elles aussi un rôle dans la fidélité de la traduction.

Les ARNr ne sont pas les seuls à subir des modifications, les protéines ribosomiques subissent également ces phénomènes.

### 2-3-b Les protéines ribosomiques

Les protéines ribosomiques interviennent dans le repliement correct des sous-unités 30S et 50S, elles sont la plupart du temps basiques et présentent en une seule copie, à l'exception des protéines L7/L12 qui sont acides et présentent en 4 copies dans la grande sous-unité, L7 étant une forme N-acétylée de L12.

Elles sont constituées d'un domaine globulaire périphérique et de longues extensions allongées qui pénètrent à l'intérieur du ribosome et aident à stabiliser la structure de ce dernier (cf. Figure 15).

Les protéines ribosomiques subissent également des modifications post-traductionnelles dont la fonction n'est pas claire. Ces modifications pourraient permettre une meilleure interaction de ces protéines avec l'ARNr ou améliorer leur reconnaissance par des facteurs non ribosomiques ou encore une optimisation de leur rôle dans le processus de traduction.

On a ainsi trouvé des méthylations (uniques ou multiples), des acétylations, des modifications par des acides glutamiques (la protéine S6 est modifiée par l'addition de 6 acides glutamiques

en C-terminal par la protéine RimK chez *E. coli* (Kang *et al.*, 1989), des isoaspartates... Une seule modification a été montrée comme étant essentielle : la monométhylation de la protéine L3 (Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007; Lhoest et Colson, 1981). Cette méthylation jouerait un rôle dans l'assemblage primaire du ribosome (Lhoest et Colson, 1981). De plus, L3 est l'une des 2 protéines initiatrices de l'assemblage du 50S, avec L24.

La plupart des protéines ribosomiques sont décrites comme jouant essentiellement un rôle dans le repliement correct du ribosome, toutefois un certain nombre de protéines jouent aussi un rôle dans les différentes activités de celui-ci. Ainsi les protéines S12, S7 et S15 interviennent dans l'interaction avec la sous-unité 50S. La protéine L5 de la grande sous-unité intervient également dans l'interaction entre les deux sous-unités (Schluzenzen *et al.*, 2000). S4, S5, S8 et S12 apportent une contribution dans la fidélité du décodage et dans le caractère unidirectionnel de la translocation. S20 joue un rôle important dans le processus de décodage.

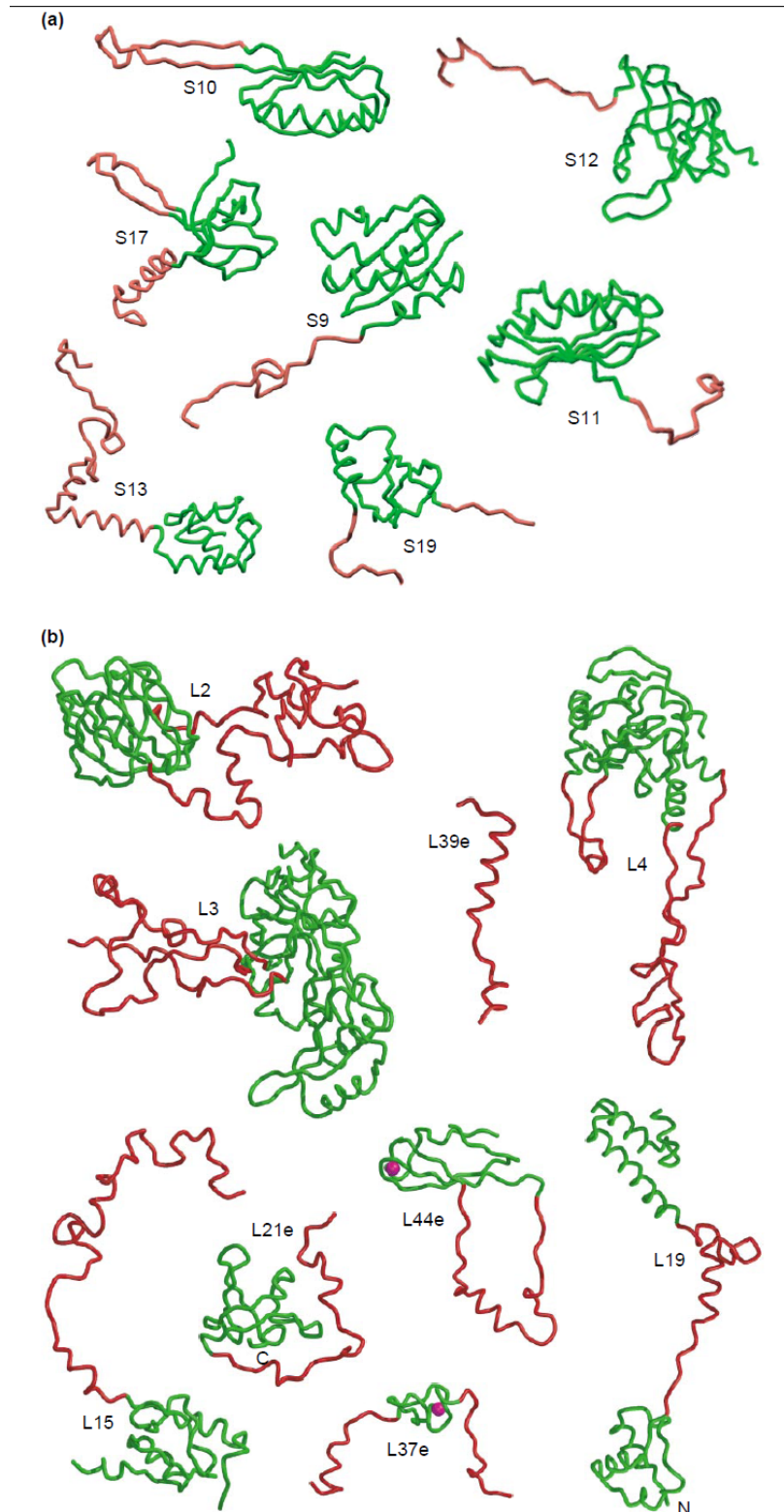
Par ailleurs, L7/L12 joueraient un rôle dans la fixation des ARNt au niveau du site A. L16 et L36 forment une partie du PTC, L16 prenant part au site A. L27 intervient dans la formation du site P. L1 est associé au site E et L1 et L12 semblent être également impliquées dans la translocation des ARNt. L7 et L2 affectent l'activité peptidyl transférase. La protéine L6 est située dans le domaine de translocation de la sous-unité 50S, à la base de la tige composée par L7/L12 et pourrait jouer un rôle dans la fidélité (Golden *et al.*, 1993). L3 est nécessaire à l'activité peptidyl transférase et étroitement associée au site A. elle a été décrite comme « gardien du passage » vers le site A. (Meskauskas et Dinman, 2007).

L36, la plus petite protéine du ribosome, uniquement trouvée chez les eubactéries (subdivision des procaryotes comprenant toutes les bactéries et excluant les archaebactéries), se fixe sur l'ARN 23S à l'interface entre plusieurs régions fonctionnelles conservées, et est importante dans la structuration de l'ARN 23S dans cette région. L'absence de cette protéine chez les eubactéries affecte la fonction du ribosome de façon importante (Maeder et Draper, 2005).

Outre leur implication dans la structure et la fonction du ribosome, certaines protéines ribosomiques ont été décrites comme jouant des rôles annexes dans la cellule.

Par exemple, L24, qui se fixe de façon précoce à l'ARN 23S et initie la nucléation nécessaire à la formation de la sous-unité 50S, serait également impliquée dans la condensation du

chromosome chez *Bacillus subtilis* (Exley *et al.*, 2001). L4, qui est l'une des premières protéines à se fixer à l'ARN 23S au niveau du domaine I (dans une région comportant également le site de fixation de L24), serait également un régulateur de sa propre expression, et des autres protéines ribosomiques contenues dans l'opéron S10 auquel elle appartient chez *E. coli* (Worbs *et al.*, 2002). S4, S7, S8, S15, S20, L1, L10, L12, L20 assurent également un rôle de régulateur transcriptionnel (Dinos *et al.*, 2005). S10 a été décrite comme un anti-terminateur de la transcription du gène codant pour la protéine N du phage  $\lambda$  chez *E. coli* (Brodersen et Nissen, 2005).



**Figure 15 : structures de différentes protéines ribosomiques. a) protéines de la petite sous-unité 30S, b) protéines de la sous-unité 50S. Les domaines globulaires sont représentés en vert et les extensions en rouge. Les protéines notées par un e sont celles qui ont été identifiées et modélisées par remplacement moléculaire à partir de structures de protéines eucaryotes homologues. D'après (Ramakrishnan et Moore, 2001).**

### 2-3-c Mécanismes de biogenèse

Des études de reconstitution *in vitro* des particules 30S, 50S et 70S ont été menées (Culver et Noller, 1999; Hosokawa *et al.*, 1966; Raue *et al.*, 1981; Traub et Nomura, 1968). Ces études ont montré que les protéines et les ARNr pouvaient former des particules ribosomiques actives en dehors de la cellule. Cela suggère d'une part que les informations nécessaires au repliement correct et à la formation des ribosomes sont contenues de façon intrinsèque dans les constituants du ribosome et, d'autre part, que la biogenèse ne nécessite pas forcément de facteurs supplémentaires pour avoir lieu. Cependant, la reconstitution d'une particule 30S à partir de protéines recombinantes s'avère être moins efficace qu'une reconstitution faite à partir d'un mélange protéique issu d'une préparation de ribosome natifs, suggérant que certaines modifications post traductionnelles pourraient être nécessaires pour l'efficacité de formation des particules (Culver et Noller, 1999).

De plus, la reconstitution nécessite un apport en énergie important, des étapes d'incubation longues, suggérant que des barrières énergétiques doivent être franchies pour permettre un repliement correct. Ceci suggère que les facteurs associés aux ribosomes et impliqués dans la biogenèse de celui-ci permettent à la cellule d'accélérer le processus. (Voir paragraphe 2-3-d).

Ces études ont permis de dresser une carte de l'assemblage des particules 30S (Connolly et Culver, 2009; Held *et al.*, 1974; Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007; Talkington *et al.*, 2005), et 50S (Nierhaus et Dohme, 1974; Raue *et al.*, 1981; Rohl et Nierhaus, 1982; Sells et Davis, 1968). La sous-unité 30S est formée durant la transcription de l'ARN 16S et commence donc en 5' de l'ARNr. Les protéines ribosomiques peuvent être rangées en trois catégories notées I, II et III (pour primaire, secondaire et tertiaire, respectivement) (cf. Figure 16). Le groupe I représente les protéines qui interagissent directement avec l'ARNr et permettent la nucléation de la particule. Les protéines secondaires (groupe II) nécessitent la fixation des protéines primaires pour se fixer et enfin les protéines du groupe III sont les protéines tardives qui nécessitent la fixation des protéines des deux groupes précédents pour se fixer à leur tour (Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007).



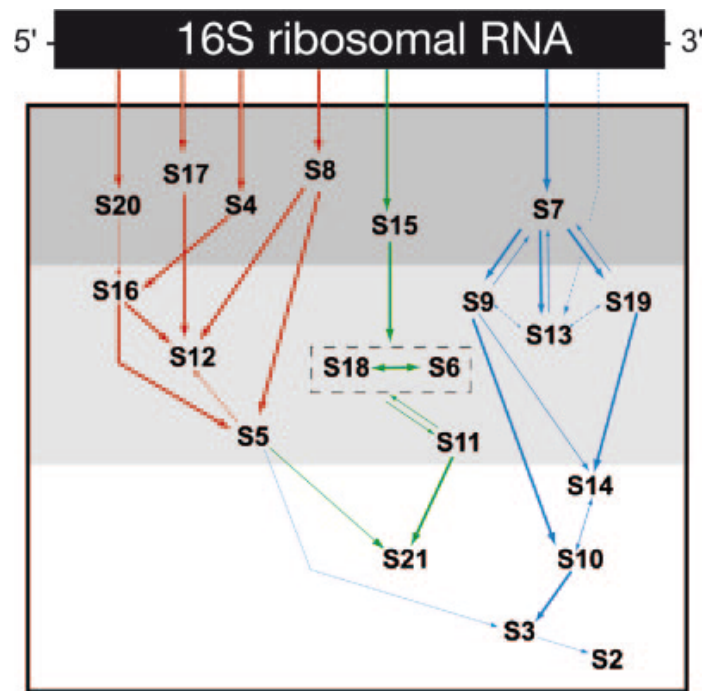


Figure 16 : cartographie de la biogenèse de la sous-unité 30S du ribosome. D'après (Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007). Les flèches rouge représentent les interactions entre les protéines formant le domaine 5', les flèches vertes représentent les interactions entre les protéines se fixant dans le domaine central et les bleues les protéines se fixant dans le domaine 3'. La région gris foncé représente les protéines du groupe I se fixant de façon précoce, la partie gris claire représente les protéines du groupe II et la partie blanche les protéines tardives du groupe III.

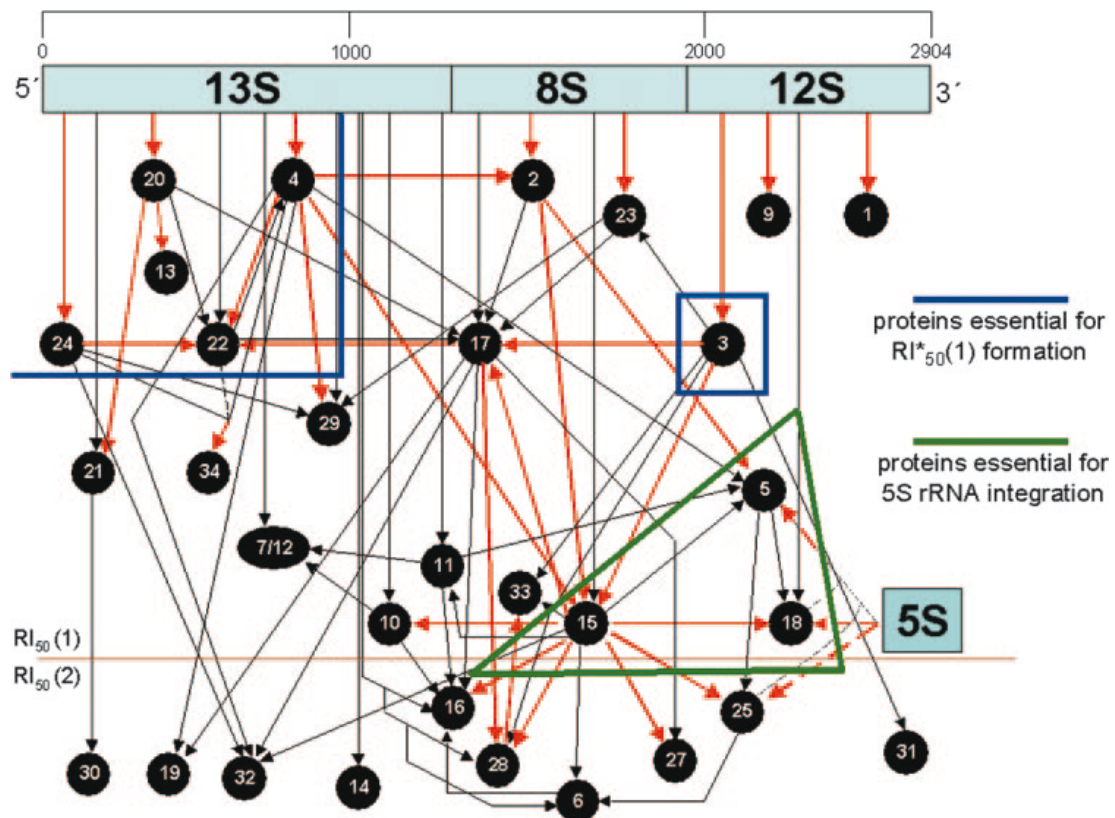
Le mécanisme d'assemblage de la sous-unité 50S est plus complexe que pour la petite sous-unité du ribosome. Les études de reconstitution *in vitro* ont montré l'apparition de trois intermédiaires nommés RI50(1), RI50\* et RI50(2) avec des coefficients de sédimentation respectifs de 33, 41 et 48S (la particule RI50\* est obtenue à partir de la particule RI50(1) après une augmentation de température qui permettrait des changements conformationnels), proches des intermédiaires qui ont pu être trouvés *in vivo* (Herold et Nierhaus, 1987).

La biogenèse *in vitro* se déroulerait donc en 3 étapes, et chaque particule intermédiaire subirait des changements conformationnels température-dépendants. La carte du chemin de repliement de la sous-unité 50S qui découle de ces expériences est montrée en Figure 17. Cependant, il n'existerait pas un mais plusieurs mécanismes de biogenèse.

Les températures appliquées à la reconstitution *in vitro* ne sont pas forcément en accord avec les conditions rencontrées *in vivo*. Ceci suggère que le chemin de repliement du ribosome

rencontre des barrières énergétiques qui rendent le processus lent, incompatible avec les besoins cellulaires.

Des facteurs associés aux ribosomes pourraient jouer un rôle dans le repliement en apportant de l'énergie via une activité enzymatique ou en modifiant et/ou en recrutant les différents constituants du ribosome afin que le repliement soit facilité et accéléré.



**Figure 17 : cartographie de la biogenèse de la sous-unité 50S. Les protéines nécessaires pour la formation du premier intermédiaire et pour la transition de RI50(1) vers RI50\* sont encadrées en bleu, les protéines nécessaires à l'intégration de l'ARN 5S sont encadrées en vert. Les flèches rouges présentent les fortes dépendances des protéines pour la fixation à l'ARN et les flèches noires les dépendances faibles. D'après (Kaczanowska et Ryden-Aulin, 2007).**

2-3-d Les protéines non ribosomiques impliquées dans la biogenèse du ribosome

La biogenèse du ribosome *in vivo* nécessite un certain nombre de facteurs d'assemblage dont beaucoup ne sont pas encore connus. Parmi les protéines identifiées, on dénombre des hélicases, des chaperonnes ou encore des protéines de modification de l'ARNr comme KsgA ou RrmJ. A l'instar des mécanismes de biogenèse du ribosome, leur rôle exact et leur implication dans le repliement restent obscurs. Toutefois, l'identification des protéines associées au ribosome s'accélère depuis quelques années. En effet, les programmes de séquençage des génomes ont révélé bon nombre de gènes préalablement non identifiés. Une partie de ces gènes codent pour des GTPases, essentielles à la croissance bactérienne et de fonction inconnue (Brown, 2005). Certaines de ces GTPases s'avèrent être impliquées dans la biogenèse du ribosome. La plupart d'entre elles appartiennent à la classe TRAFAC et s'avèrent être des HAS-GTPases (voir plus haut) (Britton, 2009). Les GTPases impliquées dans la biogenèse du ribosome possèdent toutes un ou plusieurs domaines supplémentaires associés au domaine G. Récemment, plusieurs protéines telles que Era, RsgA ou YqeH ont été décrites comme jouant un rôle dans l'assemblage de la sous-unité 30S du ribosome. D'autres protéines comme RbgA, Obg, YihA ou EngA sont impliquées dans la formation de la grande sous-unité du ribosome.

Toutes ces GTPases ont souvent une affinité pour le GTP et une activité GTPase faible. Cette activité GTPase est, la plupart du temps, activée de façon importante lorsque ces protéines interagissent avec le ribosome.

- ⇒ RsgA (YjeQ, YloQ) n'est pas une protéine essentielle chez les bactéries. Toutefois la délétion de son gène affecte la croissance. Elle a été beaucoup étudiée chez *B. subtilis* et *E. coli* et est capable de se lier à la sous-unité 30S ou au ribosome entier via son domaine N-terminal. Elle pourrait être impliquée dans la formation de la sous-unité 30S. Cependant, les mutants de délétion générés n'ont montré aucune particule 30S ou 50S non mature mais une proportion plus faible de ribosome 70S, ce qui suggère qu'elle serait plutôt impliquée dans l'association des deux sous-unités (Campbell *et al.*, 2005; Daigle et Brown, 2004).

- ⇒ YqeH est une GTPase qui a la particularité d'avoir une permutation circulaire des motifs spécifiques des GTPases dans sa séquence (G4-G5-G1-G2-G3 au lieu de G1-G2-G3-G4-G5). Cette GTPase serait impliquée dans la biogenèse de la sous-unité 30S. En effet, les mutants de délétion montrent une absence de sous-unité 30S dans la cellule (Loh *et al.*, 2007; Uicker *et al.*, 2007). Contrairement à RsgA ou Era, son activité GTPase n'est pas activée par l'interaction avec le ribosome mais l'est par le potassium (Anand *et al.*, 2010).
- ⇒ RbgA est une GTPase conservée des bactéries aux eucaryotes mais absente chez les  $\gamma$ -protéobactéries. Elle semble impliquée dans la biogenèse de la sous-unité 50S. Les mutants de délétion pour ce gène montrent un profil ribosomique altéré avec une diminution de particule 70S et une sous-unité 50S mal formée qui possède un coefficient de sédimentation de 45S. Ces particules présentent des défauts en protéines L16, L27 et L36. YlqF interagit avec le 45S ou le 50S de façon nucléotide dépendante. Elle interviendrait tardivement dans la biogenèse du ribosome et servirait à recruter les protéines L16, L27, et L36 au niveau du ribosome (Britton, 2009; Schaefer *et al.*, 2006; Uicker *et al.*, 2006).
- ⇒ Obg est une GTPase essentielle conservée, des bactéries à l'homme. Son rôle dans les bactéries reste obscur puisqu'elle a été décrite comme intervenant dans la ségrégation chromosomique, la réponse générale au stress, la sporulation et la réplication ainsi que dans l'assemblage de la sous-unité 50S du ribosome. La surexpression de cette protéine, chez *Bacillus*, complémente la mutation du gène *rrmj* (Tan *et al.*, 2002). Les mutants de délétion pour Obg montrent une accumulation des sous-unités 30S et 50S au détriment de la particule 70S dans la bactérie, et les sous-unités 50S sont mal formées et se dissocient en particule 40S sous certaines conditions salines. Obg est capable d'interagir avec SpoT et jouerait également un rôle dans la réponse stringente (Foti *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2005).

⇒ YsxC, est une GTPase essentielle conservée dans tous les domaines du vivant, mais n'est pas ubiquiste chez les trois règnes (elle n'est pas retrouvée chez la drosophile ou l'homme par exemple). Elle a tout d'abord été décrite comme jouant un rôle dans la division cellulaire et la progression du cycle cellulaire puis comme étant impliquée dans la biogenèse de la sous-unité 50S du ribosome. Le mutant de délétion pour YsxC montre également des profils ribosomiaux altérés avec une sous-unité 50S mal formée migrant comme une particule de 44,5S. Les protéines L16, L27 et L36 sont manquantes dans ces sous-unités altérées. Sa fixation au ribosome est également dépendante du nucléotide. Elle a été montrée comme capable d'interagir avec les protéines L1, L6 et L7/L12 (Pragai et Harwood, 2000; Schaefer *et al.*, 2006; Wicker-Planquart *et al.*, 2008).

D'autres protéines sont suspectées d'intervenir dans la biogenèse du ribosome et le nombre de ces protéines devrait aller en augmentant dans un avenir proche.

Une autre GTPase, EngA (YphC, YfgK, Der) fait partie des protéines récemment mises en évidence et impliquée dans la biogenèse du ribosome. YphC, la protéine de *Bacillus subtilis*, est le sujet de ce travail et sera donc traitée plus en détail dans le chapitre suivant.

### **3-YphC**

YphC est une protéine de *Bacillus subtilis* composée de 436 résidus pour une masse moléculaire de 48,6 kDa et un point isoélectrique théorique de 5,2. Elle est codée par un gène de 1308 pb et est en opéron avec le gène *gpsa* chez *Bacillus subtilis* (cf. Figure 18) ; cette organisation génétique n'est pas conservée chez les différentes espèces bactériennes.

Ce gène est retrouvé chez pratiquement toutes les eubactéries mais pas chez les archaebactéries ni chez les eucaryotes, à l'exception d'un exemplaire chez *Arabidopsis thaliana* qui pourrait provenir d'une bactérie symbiotique. YphC a été décrite comme appartenant à la superfamille de GTPases Era, Obg, EngA, MnmE, YchF et YihA (Mittenhuber, 2001).

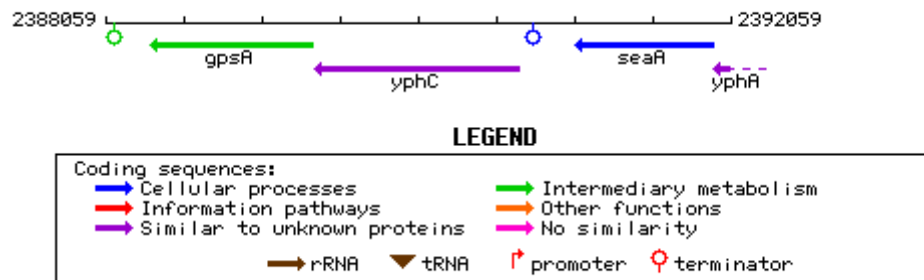


Figure 18 : région du chromosome de *Bacillus subtilis* portant le gène d'*yphC*. D'après SubtiList Web Server, Institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

Décrite pour la première fois chez *Neisseria gonorrhoeae* lors d'une étude sur le pilus et le gène *rdgC* (Mehr *et al.*, 2000), les auteurs ont montré l'impossibilité d'obtenir une souche délétée pour ce gène, suggérant le caractère essentiel de la protéine pour cette bactérie. Ils l'ont alors rebaptisé Eng A, pour « Essential Neisserial GTPase A » (Mehr *et al.*, 2000). Par la suite, d'autres études d'invalidation de gène ont confirmé son caractère essentiel chez d'autres espèces bactériennes : *Escherichia coli* (Hwang et Inouye, 2001), *Salmonella enterica* sv typhimurium (Knuth *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis* (Morimoto *et al.*, 2002) *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* (Zalacain *et al.*, 2003). Le gène *yphc* a été proposé comme faisant partie du génome minimal nécessaire à la vie bactérienne (Gil *et al.*, 2004).

Peu de données sont disponibles concernant l'expression du gène *in vivo*. Toutefois, la quantité de protéine a été estimée à 7000 molécules par cellule chez *Bacillus subtilis* (Morimoto *et al.*, 2002) suggérant une expression constitutive. Enfin, l'expression de EngA est activée de l'ordre de 8 fois par l'interféron  $\gamma$  chez *Chlamidophila pneumoniae* (Polkinghorne *et al.*, 2006).

### 3-1 Structure

L'étude de la séquence de cette protéine montre qu'elle est très conservée et possède les motifs spécifiques des GTPases G1 à G4, la plaçant dans la famille des GTPases. Cependant,

elle présente la particularité de posséder ces motifs deux fois dans sa séquence, ce qui laisse supposer que cette protéine porte deux domaines G en tandem, faisant d'elle une protéine unique. L'alignement des séquences homologues montre une bonne conservation de la protéine (cf. Figure 19).

Les motifs spécifiques de cette famille peuvent être ainsi établis :

Motif G1 : GRPNVGKST pour le domaine 1 et GRPNVGKS S/T pour le domaine 2

Motif G2 : GhTRDR pour le domaine 1 ou h est un acide aminé hydrophobe et GTTRD pour le domaine 2

Motif G3 : hhDTGG pour le domaine 1 hhDTAG pour le domaine 2

Motif G4 : NKXD pour le domaine 1 et NKWD pour le domaine 2

Motif G5 : absent du domaine 1 et SAL/K pour le deuxième domaine.

La ressemblance des motifs entre les deux domaines suggère une duplication de gène et l'homologie des motifs G2 semble indiquer que les deux domaines interagiraient avec les mêmes effecteurs. Il a été proposé que cette protéine serait issue d'une duplication du gène codant pour la protéine Era et la protéine a été, à ce titre, rebaptisée Der, pour Double-Era. La résolution de la structure 3D de l'orthologue de *Thermotoga maritima*, Der, en 2002 a confirmé cette hypothèse (Robinson *et al.*, 2002) et a permis de montrer que ces deux domaines G, N-terminaux, notés GD1 et GD2, sont reliés entre eux par une boucle acide plus ou moins longue selon son origine. De plus, la partie C-terminale montre un repliement connu mais peu caractérisé, appelé KH (pour K-Homology), qui serait impliqué dans la fixation des acides nucléiques. Cependant, le motif spécifique de fixation définit pour ce domaine (VIGXXGXXI ou X est un acide aminé quelconque) semble être manquant ou dégénéré (cf. paragraphe sur Era).



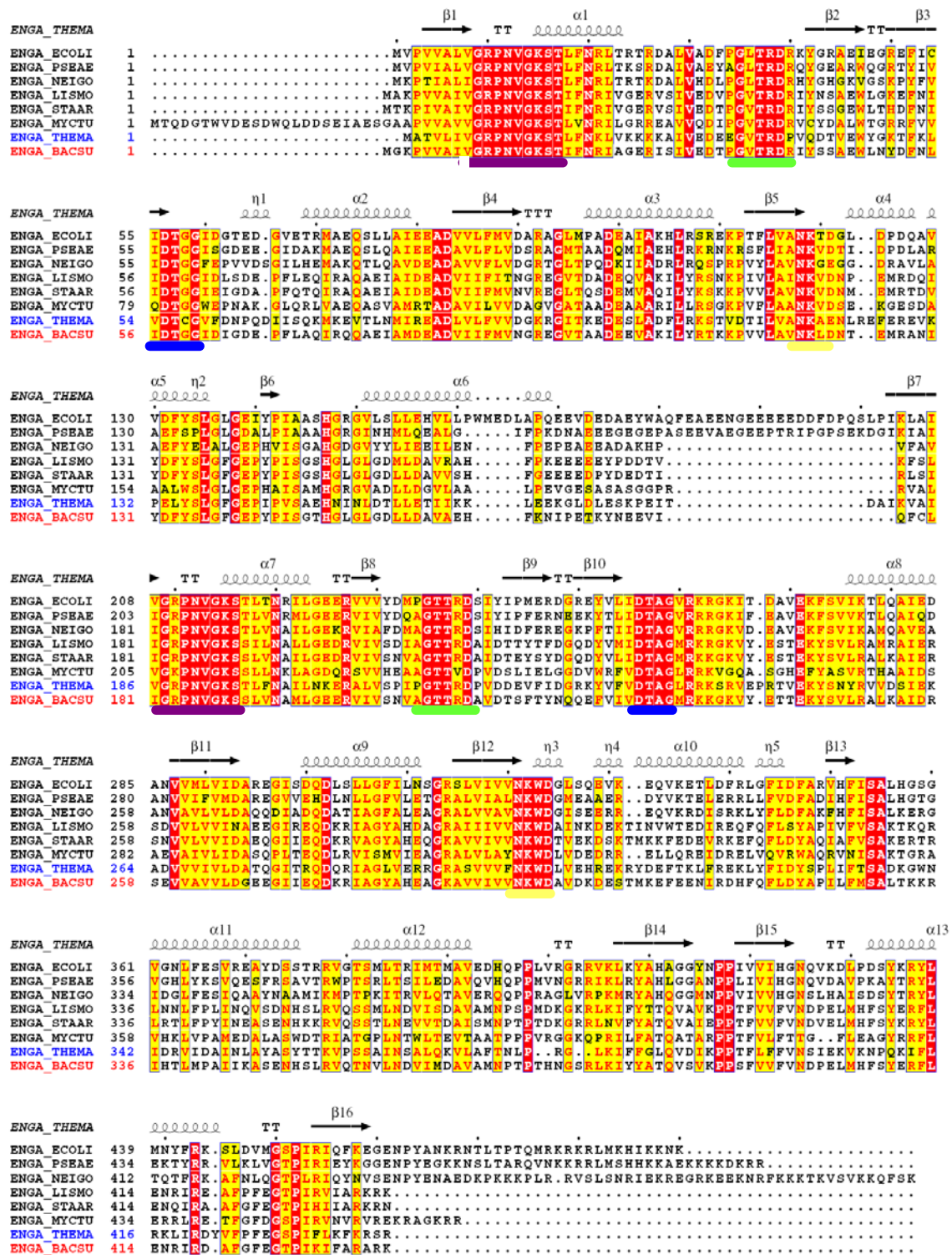
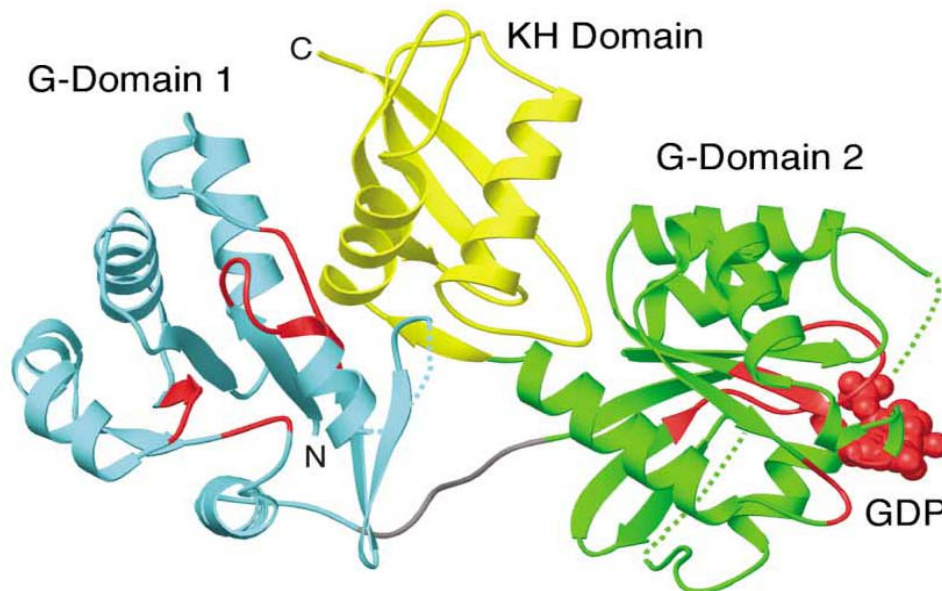


Figure 19 : alignement de séquences de quelques orthologues d'YphC, issus de différentes espèces bactériennes. THEMA : *Thermotoga maritima* ; ECOLI : *Escherichia coli* ; PSEAE : *Pseudomonas aeruginosa* ; NEIGO : *Neisseria gonorrhoeae* ; LISMO : *Listeria monocytogenes* ; STAAR : *Staphylococcus aureus* ; MYCTU : *Mycobacterium tuberculosis* ; BACSU : *Bacillus subtilis*. Les éléments de structure secondaire de la protéine de *T. maritima* sont indiqués au dessus de l'alignement. Les motifs G1 sont soulignés en violet, G2 en vert, G3 en bleu et G4 en jaune. Figure réalisée avec le logiciel ESPRIT (<http://espruit.ibcp.fr/ESPrut/cgi-bin/ESPrut.cgi>).

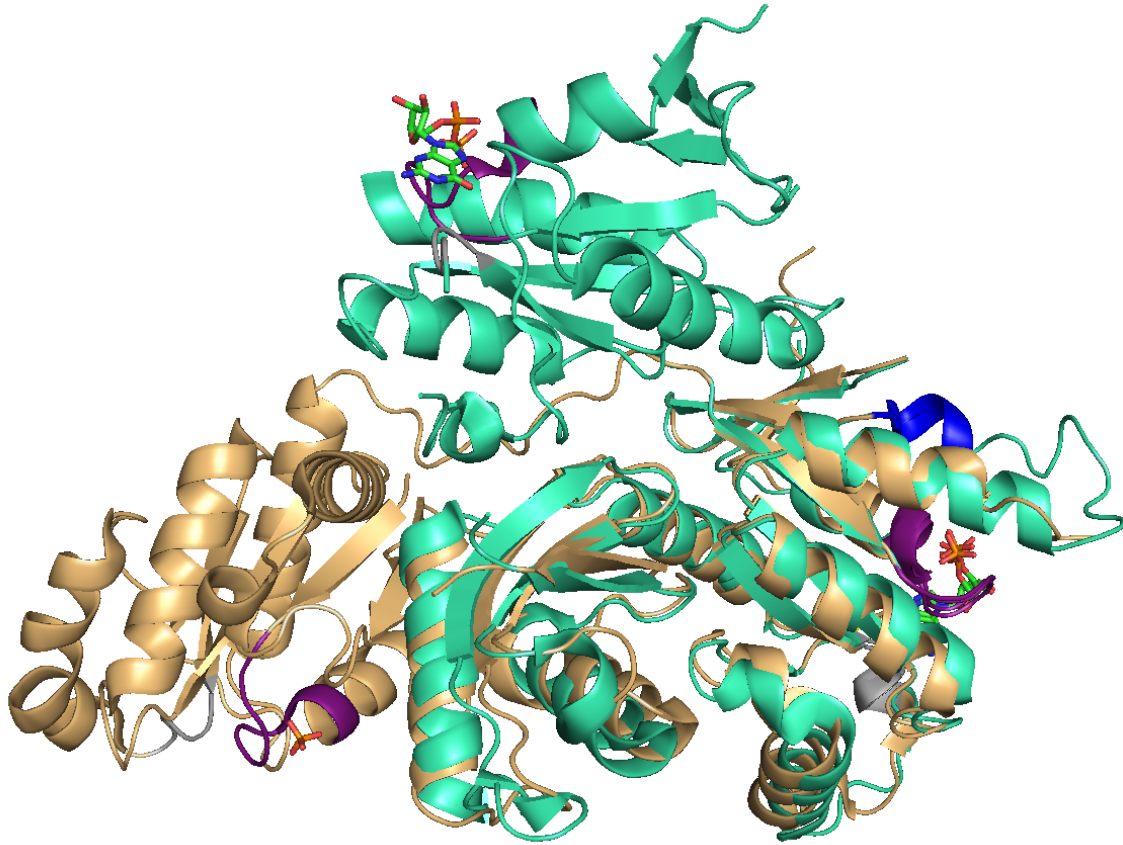


Cette structure montre la protéine fixant un GDP au niveau du domaine GD2 alors qu'aucun nucléotide n'a été rajouté dans les conditions de cristallisation. Ceci suggère que ce nucléotide est issu de la bactérie dans laquelle la protéine a été produite, *E. coli*, mais surtout que ce domaine possède une affinité forte pour le GDP (cf. Figure 20).



**Figure 20 :** structure de Der de *Thermotoga maritima*, tirée de (Robinson *et al.*, 2002). Le domaine GD1 est représenté en cyan, le domaine GD2 en vert et le domaine KH en jaune. Les motifs spécifiques des GTPases sont en rouge et le GDP est représenté sous forme de boules rouges. Les régions non résolues sont représentées en pointillés.

Une seconde structure 3D a été résolue en 2006, celle d'YphC de *Bacillus subtilis* (Muench *et al.*, 2006). Cette fois-ci, les auteurs ont introduit, dans les conditions de cristallisation, du GDP, permettant de résoudre la structure de la protéine possédant un GDP dans chaque site de fixation. Cette structure montre que le domaine GD1 s'oriente différemment lorsqu'il fixe du GDP, laissant supposer un mouvement ample de la protéine au cours de l'hydrolyse du GTP et du cycle catalytique - environ 60 Å (Cf. Figure 21).



**Figure 21 : superposition des structures de EngA : structure de Der de *Thermotoga maritima* (fichier PDB 1MKY) (en orange) et d'YphC de *Bacillus subtilis* (fichier PDB 2HGJ) (en vert). La superposition est réalisée sur les domaines GD2 et KH des deux structures. Les motifs G1 sont colorés en violet, les motifs G3 en bleu foncé, les motifs G4 en jaune. Les molécules de GDP et les phosphates sont représentées en bâtonnets colorés en fonction des atomes. Les « switch I et II » sont manquants dans les deux structures. Figure réalisée avec le logiciel Pymol (Delano scientifique).**

Dans ces deux structures, les régions « switch I » sont manquantes au niveau des deux domaines de même que les régions « switch II » sont manquantes, sauf dans le domaine GD2 de la structure d'YphC de *Bacillus subtilis* (« switch II » représenté en bleu).

### 3-2 Etudes biochimiques

Peu d'études biochimiques ont été effectuées sur YphC et ses homologues, et souvent, ces études sont succinctes. Ainsi, des tests enzymatiques ont été menés sur différents orthologues de la protéine, confirmant qu'il s'agit bien d'une GTPase active, capable d'hydrolyser du GTP *in vitro*. Ainsi Der de *Thermotoga maritima* hydrolyse du GTP à 70°C avec un  $K_m$  de 110  $\mu M$ .

et une constante catalytique  $k_{cat}$  de  $0,87\text{min}^{-1}$ . Der est capable de fixer du GTP du GDP et du dGTP mais pas du GMP ou des nucléotides adényliques. Il a également été montré que le potassium augmente l'activité de Der de façon importante. (Hwang et Inouye, 2001). La mutation de l'asparagine en aspartate dans le motif 4 (NKXD) soit dans le premier domaine soit dans le deuxième domaine induit une diminution d'activité GTPase dans un cas et une légère augmentation de l'activité dans l'autre cas. La double mutation entraîne une diminution importante de l'activité. L'étude préliminaire des activités sur les domaines séparés montre que les deux domaines possèdent une activité GTPase mais que le domaine GD1 a une activité un peu plus importante que le GD2 (Robinson *et al.*, 2002).

La mutation de la lysine et la serine conservées de la P-loop (GX<sub>4</sub>GKT/S) chez EngA de *E. coli* montrent un  $K_M$  et un  $K_{cat}$  diminué pour ces mutants quel que soit le domaine ciblé (Bharat *et al.*, 2006). Enfin, une étude par microcalorimétrie de la protéine chez *Salmonella typhimurium* a montré que les deux sites ne seraient pas équivalents en termes d'affinité pour les nucléotides. En effet, les constantes mesurées, en absence de magnésium, montrent deux sites : l'un de forte affinité et l'autre de faible affinité. Ainsi, le site de forte affinité pour le GDP montre une constante de dissociation ( $K_d$ ) de  $0,6\text{ }\mu\text{M}$  alors que celui de faible affinité possède un  $K_d$  de  $3,2\text{ }\mu\text{M}$ . Pour le GTP, le  $K_d$  a été mesuré pour un seul des deux sites, car l'autre site présente une affinité trop faible pour être mesurée par cette technique. Le site de forte affinité présenterait un  $K_d$  de  $12,7\text{ }\mu\text{M}$  pour le GTP en absence de magnésium. Cette étude ne discrimine pas les sites et ne précise pas si le site de faible affinité pour le GTP est le même que le site de faible affinité pour le GDP (Lamb *et al.*, 2007).

### 3-3 Etudes fonctionnelles

Les études d'inactivation de gène ont montré le caractère essentiel du gène chez diverses espèces bactériennes. Ces expériences ont également nécessité la construction de mutants conditionnels permettant une déplétion des bactéries en YphC ou ses orthologues. Ces expériences ont permis de mettre en évidence un phénotype donnant des indications sur le rôle de la protéine *in vivo*. Ainsi chez *E. coli*, des bactéries allongées, forment des filaments et présentent une ségrégation chromosomique altérée. Ces résultats suggèrent alors une implication de la protéine dans la division cellulaire ou dans la ségrégation chromosomique (Hwang et Inouye, 2001).

La surexpression d'EngA compenserait l'effet produit par la mutation du gène *rrmJ* chez *E. coli* (Tan *et al.*, 2002). RrmJ est une méthyltransférase qui modifie l'uridine en position 2552 de l'ARNr 23S (voir chapitre sur les ribosomes). La délétion de ce gène entraîne un défaut de croissance bactérienne et une accumulation des sous-unités 30S et 50S au détriment du ribosome 70S. La complémentation d'une souche délétée pour ce gène par la surexpression d'EngA suggère un rôle de cette dernière dans l'assemblage ou la biogénèse du ribosome.

Une autre étude a montré que la surexpression de RelA chez *E. coli* complèterait le défaut de croissance lié à la mutation de Der (EngA) (Hwang et Inouye, 2008). RelA est une protéine associée au ribosome, impliquée dans la réponse stringente chez la bactérie, et responsable de la synthèse de ppGpp et pppGpp en cas de déplétion en acide aminés ou source carbonée dans le milieu environnant la bactérie (Magnusson *et al.*, 2005; Srivatsan et Wang, 2008).

Il a été montré par la suite que la déplétion de YphC chez *B. subtilis* ou Der chez *E. coli* entraîne une accumulation de particules 50S et 30S au détriment de particules 70S (Bharat *et al.*, 2006; Hwang et Inouye, 2006; Schaefer *et al.*, 2006). Plus particulièrement, la déplétion entraînerait une altération dans le profil ribosomique sur gradient de saccharose et provoquerait un défaut de maturation de la sous-unité 50S du ribosome (Bharat *et al.*, 2006; Schaefer *et al.*, 2006). Des expériences d'interaction entre la protéine et les ribosomes ont montré que YphC est capable d'interagir avec les ribosomes de façon nucléotide dépendante (Schaefer *et al.*, 2006) et spécifiquement avec la sous-unité 50S du ribosome mais pas avec la sous-unité 30S ni le ribosome 70S. (Bharat *et al.*, 2006; Hwang et Inouye, 2006). Ces études suggèrent également que les deux domaines sont nécessaires à la fonction de la protéine dans la bactérie.

Une étude plus récente a montré que Eng A d' *E. coli* serait capable non seulement de se lier à la sous-unité 50S du ribosome mais également à la sous-unité 30S et à la particule 70S du ribosome de façon nucléotide dépendante (Tomar *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent que la fixation du GTP au domaine 2 de la protéine est nécessaire à l'interaction avec le ribosome et que la fixation du GTP sur le domaine 1 renforce cette interaction. Par ailleurs, ils suggèrent que selon le nucléotide fixé sur l'un ou l'autre des domaines, la protéine interagit avec une sous-unité différente du ribosome. Le domaine GD1 est présenté comme un modulateur de cette fixation grâce aux mouvements amples qu'il subit lors du cycle catalytique (voir le

paragraphe sur la structure d'YphC). De plus, le domaine KH seul serait capable d'interagir avec la sous-unité 30S du ribosome.

Cette mise en évidence d'une interaction d'EngA avec la sous-unité 30S du ribosome est confortée par la mise en évidence d'une interaction d'EngA de *Salmonella typhimurium* avec la protéine S7 du ribosome (Lamb *et al.*, 2007). Le domaine KH semble être également important pour la reconnaissance de la sous-unité 50S et plus généralement du ribosome par la protéine chez *E. coli* (Hwang et Inouye, 2010)

Bon nombre d'études de phosphoprotéomes ont été réalisées chez divers organismes ces dernières années. Dans la plupart des cas, EngA n'est pas retrouvée parmi les protéines phosphorylées dans les conditions utilisées. Toutefois, une étude de phosphoprotéome chez *Pseudomonas* a montré que EngA était phosphorylée sur la sérine 34 chez *Pseudomonas putida* (Ravichandran *et al.*, 2009), une seconde étude de phosphoprotéome chez *Streptococcus pneumoniae* a également mis en évidence une phosphorylation sur la thréonine 5 (Sun *et al.*, 2009). Les phosphorylations ont, la plupart du temps, un rôle régulateur de l'activité des protéines dans la cellule et particulièrement parmi les GTPase (la voie des MAP kinase chez les eucaryotes en est un exemple). On peut supposer alors que la phosphorylation de EngA régulerait l'activité de la protéine *in vivo*.

Toutes ces études tendent à montrer une implication d'YphC dans la biogenèse du ribosome. Le caractère essentiel de cette protéine, son occurrence exclusivement bactérienne, son rôle potentiel dans la biogenèse du ribosome renforcent l'intérêt d'étudier une telle protéine. Non seulement elle apparaît comme une bonne cible thérapeutique pour la découverte et l'étude de nouveaux antibiotiques mais sur un plan biochimique, l'étude de ses mécanismes de fonctionnement est particulièrement intéressante. Toutefois, l'étude d'une telle protéine est rendue complexe par la présence de deux sites GTPases en tandem.

# MATERIELS ET METHODES



## **1-Matériels**

### **1-1 Souches bactériennes**

**E. coli TOP 10** : F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

**E. coli XL1Blue** : *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacIqZ* $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)].

**E. coli BL21(DE3)** : F-,*ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>*,*m<sub>B</sub><sup>-</sup>*),*dcm* , *gal*, l(DE3) (Novagen)

**E. coli C41(DE3)** : mutant ponctuel des *E. coli* BL21 (F-, *hsdSB* (*rB*-, *mB*-), *dcm*, *gal*, *lon*, *ompT*), prophage  $\lambda$ DE3. (Miroux et Walker, 1996)

**Bacillus subtilis 168** : *trpC2*

### **1-2 Vecteurs plasmidiques**

**pCR Blunt** : vecteur de clonage déjà linéarisé avec des extrémités franches (dite « blunt ») afin de permettre l'insertion d'un fragment d'ADN ou d'un gène possédant des extrémités franches. Ce vecteur est ouvert au niveau d'un gène *cddb* létal pour la bactérie, permettant la sélection des clones possédant l'insert. Il possède un gène de résistance à la kanamycine et le gène de résistance à la zéocine (cf. Figure 22).

**pET15b** : vecteur d'expression permettant de mettre le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7, inductible par l'IPTG. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline (cf. Figure 23). Ce vecteur doit être introduit dans des bactéries possédant une copie du gène codant pour la T7 DNA polymérase. Ces souches bactériennes sont dites DE3.



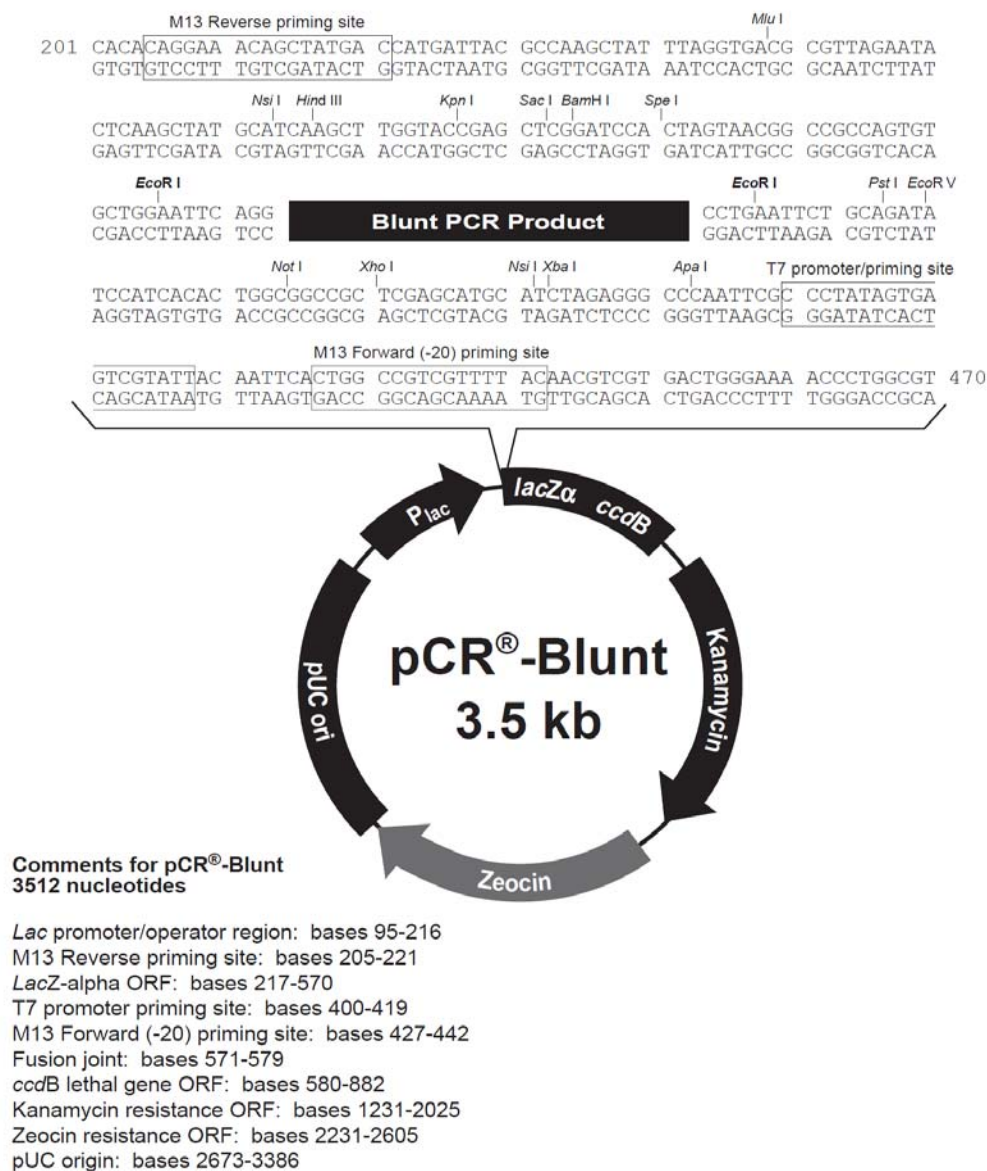


Figure 22 : carte du vecteur de clonage pCR Blunt (invitrogen)

**pET-15b sequence landmarks**

|                                                            |            |
|------------------------------------------------------------|------------|
| T7 promoter                                                | 463-479    |
| T7 transcription start                                     | 452        |
| His•Tag coding sequence                                    | 362-380    |
| Multiple cloning sites<br>( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I) | 319-335    |
| T7 terminator                                              | 213-259    |
| <i>lac</i> I coding sequence                               | (866-1945) |
| pBR322 origin                                              | 3882       |
| <i>bla</i> coding sequence                                 | 4643-5500  |

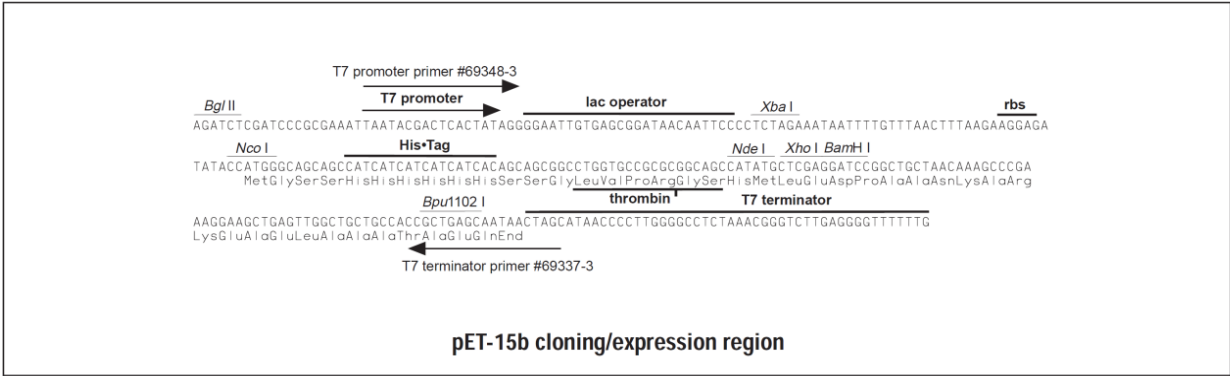
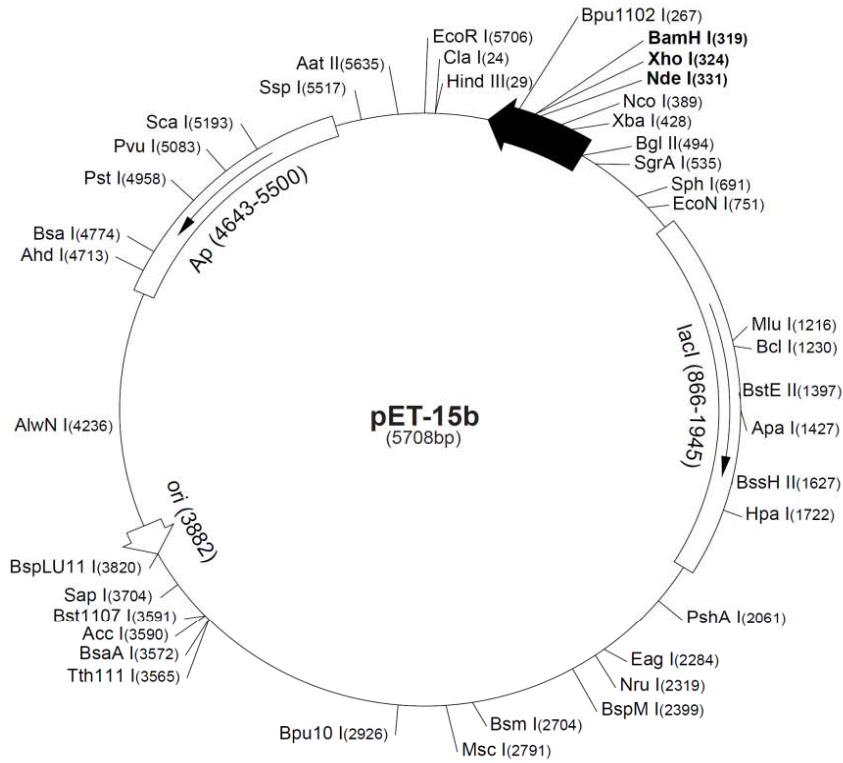


Figure 23 : carte du vecteur d'expression pET 15b (Novagen)

1-3 oligonucléotides utilisés

Un certain nombre d'oligonucléotides ont été utilisés dans ce travail, afin d'amplifier et cloner le gène de *yphC* mais aussi de générer les mutants ponctuels et les mutants de délétion nécessaires.

Ces oligonucléotides ont été synthétisés par la société MWG et sont répertoriés dans le Tableau 1. Les sites de restriction insérés sont soulignés et les mutations générées sont indiquées en rouge.

| Nom       | Séquence 5'-3'                                                    | T <sub>m</sub><br>°C | T°C<br>hybrida<br>tion<br>utilisée |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| YphC-5'   | GGG <u>CATATG</u> GGTAAACCTGTCGTAGCCATTGTC<br>NdeI                | 70,7                 | 55                                 |
| YphC-N3'  | GGG <u>GCTCAGC</u> TTATTTTCTAGCTCTTGCAAATAT<br>BlnI               | 67,1                 | 55                                 |
| K16A      | CGGGAGACCAAATGTAGGA <u>GCTAGC</u> ACAATCTTTAACCGG<br>NheI         | 73,1                 | 57                                 |
| K16A-rev  | CCGGTTAAAGATTGT <u>GCTAGC</u> TCCTACATTGGTCTCCCG<br>NheI          | 73,1                 | 57                                 |
| N119D     | GCCTGTTGTTTTAGCGGTTGAT <u>AAGCTT</u> GATAACACAGAAATG<br>HindIII   | 70,4                 | 57                                 |
| N119D-rev | CATTTCTGTGTTATC <u>AAGCTT</u> ATCAACCGCTAAAACAACAGGC<br>HindIII   | 70,4                 | 57                                 |
| D122N     | GCCTGTTGTTTTAGCGGTTAATA <u>AAGCTT</u> AATAACACAGAAATG<br>HindIII  | 68,5                 | 57                                 |
| D122N-rev | CATTTCTGTGTTATTA <u>AAGCTT</u> ATTAACCGCTAAAACAACAGGC<br>HindIII  | 68,5                 | 57                                 |
| K188A     | GACGTCCAAATGTCGGA <u>GCTAGC</u> TCATTGTGAATGCG<br>NheI            | 73,8                 | 57                                 |
| K188A-rev | CGCATTCACAAGTGA <u>GCTAGC</u> TCCGACATTTGGACGTC<br>NheI           | 73,8                 | 57                                 |
| N295D     | CGTCATCGTC <u>GTCGAC</u> AAATGGGATGCTGTTG<br>Sall                 | 70,8                 | 57                                 |
| N295D-rev | CAACAGCATCCCATTT <u>GTCGAC</u> GACGATGACG<br>Sall                 | 70,8                 | 57                                 |
| W297L     | CGTCGTCATCGTCGTAAACA <u>AAGCTT</u> GATGCTGTTGACAAAGATG<br>HindIII | 73,2                 | 57                                 |
| W297L-rev | CATCTTTGTCAACAGCATC <u>AAGCTT</u> TGTTTACGACGATGACGACG<br>HindIII | 73,2                 | 57                                 |
| D298N     | GTCGTAAACAAATGGAATGCTGTTGACAAAGATGAGAGC                           | 69,5                 | 57                                 |
| D298N-rev | GCTCTCATCTTTGTCAACAGCATCCATTTGTTTACGACG                           | 69,5                 | 57                                 |
| GD1 3'    | <u>GCTGAGC</u> AATGTTTTTAAAATGCTCTGCAAC<br>BlnI                   | 64,2                 | 58                                 |
| GD2 5'    | <u>CATATG</u> GAAGTTATTCAATTCTGTCTGATC<br>NdeI                    | 61,3                 | 58                                 |
| GD2-3'    | <u>GCTGAGC</u> TGAATGATTTTCACTAGCTTTGATAATCG<br>BlnI              | 67,2                 | 58                                 |
| KH 5'     | <u>CATATG</u> CTTCGAGTTCAAACAAACGTC<br>NdeI                       | 61,9                 | 55                                 |

Tableau 1 : oligonucléotides utilisés.

## **2-Techniques de biologie moléculaire**

### **2-1 Préparation d'ADN**

#### **2-1-a ADN génomique**

*Bacillus subtilis* est mis en culture dans 5 mL de milieu LB à 37°C sous agitation pendant une nuit. La culture est alors transférée en micro tubes de 1,5 mL et centrifugée 5 min à 15000 g. Le surnageant est alors éliminé et le culot bactérien est remis en suspension dans 567 µL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 50 mM, puis 30 µL de SDS 10% et 3 µL de protéinase K à 20 mg/mL sont ajoutés. Après homogénéisation douce, les tubes sont incubés 1h à 37°C. 100 µL de NaCl 5 M et 80 µL de CTAB 10%, NaCl 0,7 M sont ajoutés aux échantillons. Après homogénéisation les tubes sont incubés 10 min à 65°C. 780 µL d'un mélange chloroforme-alcool isoamylique sont ajoutés et, après homogénéisation, les tubes sont centrifugés 5 min à 15000 g. Le surnageant (phase supérieure) est récupéré et traité par 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1). Les tubes sont centrifugés 5 min à 15000 g après homogénéisation. Le surnageant est récupéré et lavé 2 fois par un mélange chloroforme /alcool isoamylique de la même façon. Le surnageant est ensuite traité par 0,6 V d'isopropanol afin de précipiter l'ADN contenu dans cette fraction. L'échantillon est centrifugé 5 min à 15000 g et à 4°C. Le culot est récupéré et lavé par 500 µL d'éthanol 70% puis de nouveau centrifugé comme précédemment.

Le surnageant est ensuite retiré et le culot séché à l'air avant d'être resuspendu dans de l'eau distillée.

#### **2-1-b ADN plasmidique**

##### *Mini-préparation de plasmide*

Une colonie de bactéries contenant le vecteur d'intérêt est mise en culture dans 3 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié, pendant une nuit sous agitation à 37°C.

1,5 mL de la culture en phase stationnaire sont transférés dans un micro tube et centrifugé 5 min à 15 000 g.

Le surnageant est éliminé et le culot de bactéries est re-suspendu dans 200  $\mu$ L de solution P1 (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM) puis les bactéries sont lysées par lyse alcaline après ajout de 200  $\mu$ L de solution P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%). Après homogénéisation par inversion, les tubes sont laissés 5 minutes à température ambiante. Le lysat est neutralisé par ajout de 200  $\mu$ L de solution P3 (Acétate de potassium 3M pH 5,2) et, après homogénéisation par inversion, les tubes sont incubés 5 minutes dans la glace. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 15000 g afin d'éliminer les protéines précipitées, l'ADN génomique et les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite récupéré et l'ADN plasmidique qu'il contient est précipité par l'ajout de 400  $\mu$ L d'isopropanol et centrifugé 30 minutes à 15000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé par 500  $\mu$ L d'éthanol 70% et centrifugé à nouveau 10 min à 15000 g. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot d'ADN est séché à l'air avant d'être repris dans 20  $\mu$ L d'eau milliQ.

#### *Midi-préparation de plasmide*

Cette préparation de plasmide est utilisée pour obtenir des quantités plus importantes de plasmide que celles obtenues par mini-préparation.

Elle est effectuée à l'aide d'un kit commercial (Qiagen) afin d'obtenir un degré de pureté supérieur. Le protocole suivi est celui du fournisseur, le principe restant le même que pour la mini-préparation de plasmide sauf qu'une étape de purification sur colonne est ajoutée. La précipitation du plasmide en fin de protocole est obtenue de la même façon que précédemment.

#### 2-1-c Amplification par PCR

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique enzymatique, développée dans les années 1980 (Mullis et Faloona, 1987), qui permet de sélectionner et d'amplifier une séquence d'ADN spécifique *in vitro*. Cette réaction est basée sur la répétition de cycles réactionnels comportant 3 étapes : la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation d'amorce (oligonucléotides) et l'élongation des amorces par l'ADN polymérase dans le sens 5'-3'.

Dans ce travail, le gène codant pour YphC a été amplifié initialement à partir d'ADN génomique de *Bacillus subtilis*. Pour cela, 50 ng d'ADN génomique, 1 µL d'une solution mère de désoxyribonucléotides à 25 mM chacun, 0,5 µL de chaque amorce à 100 pmol /mL, 5 µL de tampon de réaction 10X adapté à la polymérase utilisée, 1 µL de polymérase à 2,5 U/µL sont introduits dans un tube de PCR de 0,2 mL. Le volume réactionnel est ajusté à 50 µL avec de l'eau distillée stérile.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur et soumis aux cycles de températures suivant :

Dénaturation 95°C pendant 5 min

Dénaturation 95°C pendant 1 min

Hybridation 55 à 60 °C (cf. tableau 1) 1 min

Elongation 72°C 1 ,5 min. pour le gène d'YphC

} 30 fois

On ajoute une étape d'élongation finale de 5 min afin de permettre à la polymérase de terminer complètement les fragments en cours d'élongation.

La polymérase utilisée est la Pfu Turbo de chez Stratagene qui a la propriété de générer des bouts francs (certaines polymérases ajoutent un A en fin de chaque étape d'élongation générant des extrémités sortantes.)

### 2-1-d Mutagenèse dirigée

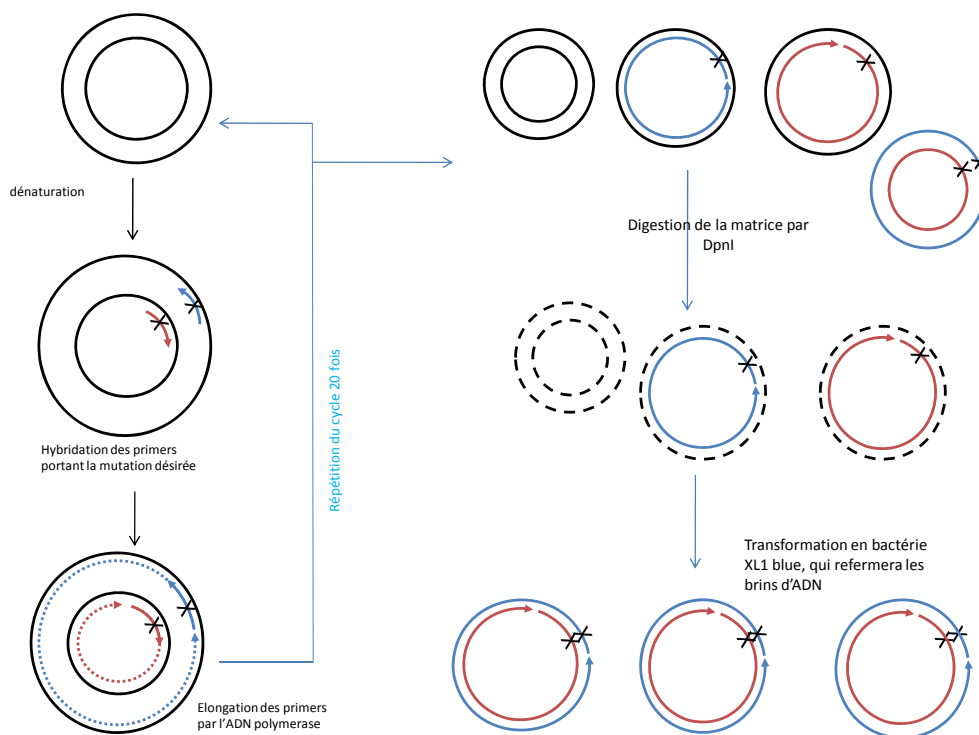
La mutagenèse dirigée consiste à muter un gène sur une seule base ou un codon afin de modifier la séquence protéique sur un acide aminé, sans toucher à l'intégrité du gène.

La technique de PCR précédemment décrite est utilisée pour générer les mutations voulues (cf. Figure 24).

Les oligonucléotides utilisés sont complémentaires de la matrice sauf au niveau de la mutation et s'apparient chacun sur un brin différent. La polymérase amplifie ensuite entièrement le plasmide portant le gène cible, permettant une amplification exponentielle des deux brins qui porteront ainsi la mutation et pourront se ré-apparier parfaitement.

Une fois l'amplification de l'ADN effectuée, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui ne clive que l'ADN méthylé. La méthylation n'est portée que par l'ADN issu des bactéries, ce qui permet d'éliminer la matrice non mutée.

Le mélange est ensuite récupéré et transformé en bactérie XL1blue pour sélectionner un plasmide muté. Pour faciliter la sélection des clones portant la mutation, l'introduction de mutations dites silencieuses (qui n'altèrent pas la séquence protéique finale) est utilisée. Ceci permet l'introduction ou la disparition d'un site de restriction qui facilitera le criblage des clones obtenus.



**Figure 24 : schéma de la mutagenèse dirigée par la méthode de « quickchange ».** Les oligonucléotides sont représentés par des flèches bleues et rouges, la mutation est représentée par une croix, les brins matrices sont représentés en noir, les brins matrices digérés sont en pointillés noirs et les brins en cours de réplication sont en pointillés bleus et rouges.

## 2-2 Clonage des gènes

### 2-2-a Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction ont la propriété de reconnaître une séquence spécifique d'ADN et de couper la chaîne ribonucléique au niveau de cette séquence dite de restriction.

L'ADN issu de mini-préparation (3 µL) ou midi-préparation (10 à 20 µL selon la quantité voulue) de plasmide est digéré par 5 ou 10 unités de chaque enzyme de restriction en tampon 1X optimal spécifié par le fournisseur (Fermentas) ajusté au volume adéquat avec de l'eau. Le mélange est incubé à la température optimale d'action de l'enzyme (en général 37°C) pendant 1 à 3 heures.

### 2-2-b Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel d'agarose est préparé à 1% d'agarose en tampon Tris 40 mM, acétate 100 mM, pH 7,5 EDTA 1 mM. Le mélange est ensuite chauffé au four micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agar. Après refroidissement 1 µL de BET à 10 mg/mL sont ajoutés et le gel est coulé en système Mupid (Eurogentec) jusqu'à solidification et formation de puits qui permettront le dépôt des échantillons d'ADN.

Un courant de 100 V est appliqué jusqu'à migration suffisante des échantillons, cette migration étant suivie à l'aide de colorant : xylène cyanol, bleu de bromophénol ou orange G (Fermentas) contenus dans le tampon de charge de l'ADN. Le gel est ensuite placé sur un banc U.V. à 335 nm permettant la visualisation de l'ADN ayant incorporé du BET entre ses bases.

### 2-2-c Purification de l'ADN sur gel

L'ADN visualisé en gel d'agarose est récupéré par découpage de la bande correspondante. Le bloc d'agarose contenant l'ADN est placé dans un micro-tube et l'ADN est extrait du gel et purifié à l'aide d'un kit " Geneclean turbo" (MP biomedical) selon le protocole du



fournisseur : après ajout d'une solution saline permettant la dissolution du gel, le tube est placé à 55°C jusqu'à liquéfaction complète du gel. L'échantillon est ensuite déposé dans une colonne et centrifugé afin d'éliminer l'agarose et le BET, la colonne est lavée à plusieurs reprises et l'ADN fixé sur la colonne est élué par 30 µL de solution d'éluion (ou 30 µL d'eau distillée stérile) et récupéré après centrifugation.

### 2-2-d Ligature

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ou par restriction doivent être introduits dans un plasmide ou vecteur d'expression. La T4 DNA ligase permet, en présence d'ATP, de rabouter les extrémités de la chaîne d'acide désoxyribonucléique.

Pratiquement, l'insert et le vecteur sont introduits dans un tube dans un rapport 5/1 en présence du tampon de réaction approprié pour la T4 DNA ligase (tampon qui contient de l'ATP). 1 unité d'enzyme est ensuite ajoutée et les tubes sont incubés une nuit à 16°C ou 1 à 2 h à température ambiante.

### **2-3 Préparation de bactéries compétentes**

Les bactéries sont rendues compétentes chimiquement par l'action du chlorure de calcium qui a la propriété de perméabiliser les membranes bactériennes et de faciliter ainsi la pénétration de l'ADN dans la bactérie. Les bactéries sont mises en culture dans 3 mL de milieu LB à 37°C sous agitation pendant une nuit. Le lendemain, 50 mL de LB sontensemencés à partir de cette pré-culture et remis à 37°C sous agitation, lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,4-0,6 unité d'absorbance, la culture est récupérée et centrifugée à 3000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est alors placé dans la glace et remis en suspension doucement par 10 mL de tampon PIPES 10 mM pH 7, CaCl<sub>2</sub> 60 mM, glycérol 15%. La suspension est incubée dans la glace pendant 1 à 6 h puis les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 1500 g 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite remis délicatement en suspension dans 2 mL du même tampon et les bactéries sont conditionnées en fractions de 50 ou 100 µL et conservées au congélateur à -80°C jusqu'à utilisation.

## **2-4 Transformation bactérienne**

Le plasmide d'intérêt est mis en contact avec 50  $\mu$ L de bactéries rendues compétentes comme décrit précédemment, et le mélange est incubé dans la glace pendant 10 minutes. Cette étape permet à l'ADN de s'adsorber sur les membranes perméabilisées des bactéries. Les bactéries sont ensuite placées dans un bain marie à 42°C pendant 1 minute afin de leur faire subir un choc thermique qui permet à l'ADN de pénétrer à l'intérieur des bactéries en fluidifiant leur membrane plasmique fragilisée. Les bactéries sont ensuite refroidies sur la glace, puis 200  $\mu$ L de milieu LB sont ajoutés et les bactéries sont incubées à 37°C sous agitation pendant 30 à 60 minutes. Cette étape permet aux bactéries de régénérer leur membrane avant d'être étalées en boîte de Pétri sur milieu LB-agar additionné de l'antibiotique adéquat (100  $\mu$ g/mL pour l'ampicilline, 50  $\mu$ g/mL pour la kanamycine).

## **3-Techniques Biochimiques**

### **3-1 Préparation des protéines**

#### **3-1-a Tests de solubilité**

Ces tests permettent de déterminer les conditions optimales de production de la protéine d'intérêt.

Une colonie de bactéries C41(DE3) transformée par le vecteur pET15b contenant le gène d'intérêt est mise en suspension dans 3 mL de milieu de culture. Le tube de culture est placé à 37 °C sous agitation et la densité optique est suivie à 600 nm. A une densité optique (D.O.) d'environ 0,8, 1 mM d'IPTG est ajouté et le tube est remplacé à 37 °C sous agitation pendant encore deux heures.

La culture est ensuite récupérée et centrifugée. Le culot bactérien de 1,5 mL de culture est alors lysé à l'aide d'une solution de B-PER<sup>TM</sup> (Pierce) (300  $\mu$ L) et passée au vortex pendant 1 minute (selon les recommandations du fournisseur). Un aliquote du lysat est prélevé et le reste du lysat est centrifugé 10 minutes à 15000 g. Le surnageant et le culot sont ensuite séparés et déposés sur gel d'acrylamide pour analyse.

Pour optimiser les conditions de productions et de lyse, le milieu de culture, la souche bactérienne la température d'induction, le pH du tampon de lyse et les quantités de sels peuvent être modulés. Les conditions permettant une surproduction optimale dans la fraction soluble sont ensuite retenues.

### 3-1-b Surproduction

Quelques colonies d'une transformation fraîche de bactéries sont ensemencées dans un litre de milieu LB supplémenté d'ampicilline à 100 µg/mL et de 1% de glucose et placé à 37°C sous agitation. Lorsque la D.O. suivie à 600 nm a atteint environ 0,8, 1 mM d'ITPG est ajouté à la culture et celle-ci est remise à 37°C pendant 4 h.

Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est alors prêt à être traité pour la purification ou conservé au congélateur à -20°C jusqu'au moment de la lyse.

### 3-1-c Purification

La purification de la protéine s'effectue en 3 étapes successives consistant en une lyse des bactéries puis deux étapes de chromatographies : affinité et gel filtration permettant la purification de la protéine d'intérêt.

#### *Lyse*

25 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, Imidazole 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5 mM et PMSF (phenylméthylsulfonyl fluoride) 1 mM, leupeptine 10 µM pepstatine A 10 µM (extemporanément) sont ajoutés. Les cellules sont cassées par deux passages successifs en presse de French à 1000 psi (16000 psi dans la cellule).

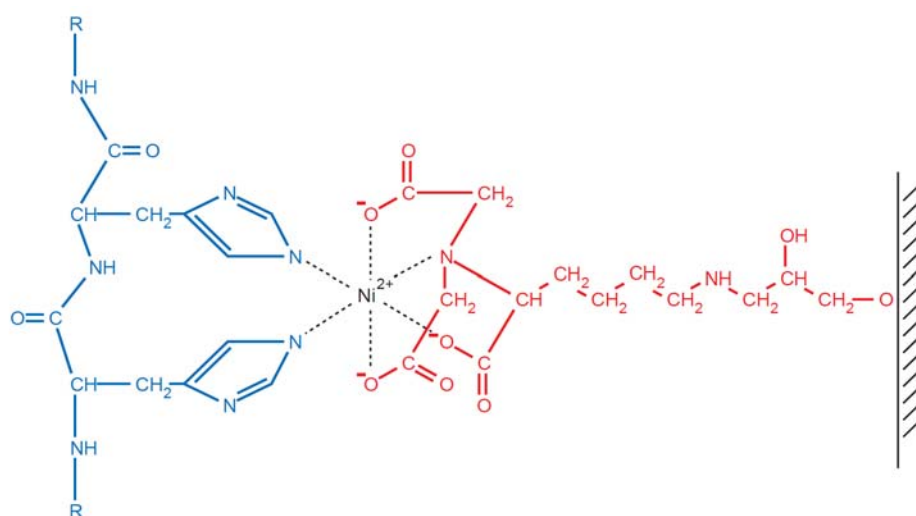
Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 15000 g afin d'éliminer l'ADN génomique et les divers débris cellulaires.

Le surnageant contenant la protéine d'intérêt soluble est récupéré pour la suite de la purification

### Colonne affinité

Le principe de la chromatographie d'affinité repose sur la spécificité d'une protéine pour son substrat. Ici, nous avons introduit une étiquette de 6 histidines du côté N-terminal de la protéine, connue pour son interaction spécifique avec les ions métalliques divalents tels que l'ion nickel ou cobalt (Porath *et al.*, 1975) (cf. Figure 25).

5 mL de résine de nickel agarose sont tout d'abord lavés à l'eau distillée puis équilibrés avec le tampon utilisé pour la lyse des bactéries et coulés dans des colonnes en plastique, « EconoColumn » (BioRad). Le liquide passant au travers de la colonne (appelé Flow Through) est récupéré et conservé pour une analyse ultérieure. La colonne est ensuite lavée 2 fois par 50 mL de Tampon Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 250 mM, imidazole 20 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5 mM, glycérol 10%. Puis la protéine retenue sur la colonne est éluée par 50 mL de Tampon Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 250 mM, imidazole 250 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5 mM, glycérol 10%.



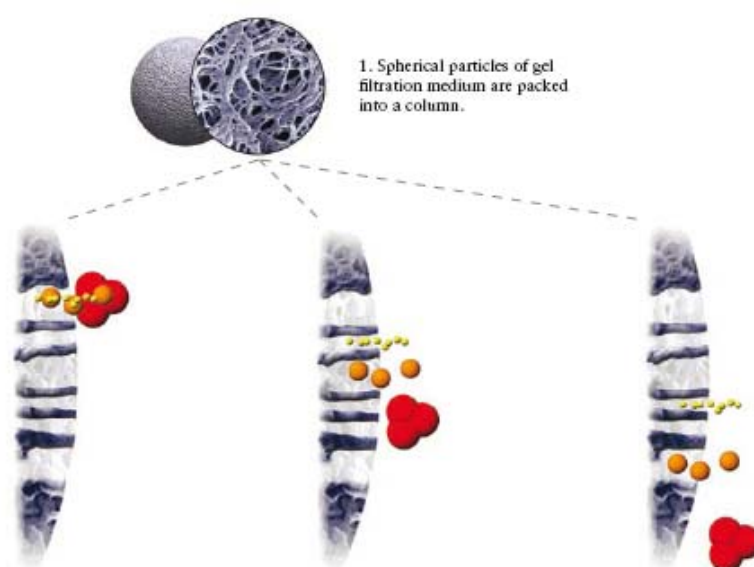
**Figure 25 : schéma de fixation d'une étiquette Histidine avec la résine Ni-NTA-agarose.** Une protéine portant une étiquette constituée de 6 histidines interagit avec l'ion Nickel greffé sur l'agarose via une molécule d'acide nitrilotriacétique (NTA). Deux liaisons restent libres sur l'ion Nickel pour interagir avec un ligand. Un greffage avec d'autres molécules comme l'acide iminodiacétique (IDA) laisse 3 électrons libres pour la liaison avec les ligands. D'après le mode d'emploi Qiagen « the QIAexpressionist ».

### *Gel filtration*

La chromatographie d'exclusion ou gel filtration consiste en une séparation des molécules en fonction de leur taille (reliée à la masse moléculaire) et de leur forme (idéalement, les principes de la chromatographie d'exclusion s'appliquent à des molécules dites globulaires).

Les protéines vont diffuser à l'intérieur des pores de la résine selon leur taille et seront ainsi éluées plus ou moins rapidement. Les protéines trop grosses, dites exclues, ne sont pas ralenties dans la colonne et sortiront donc en premier. Les plus petites seront plus retenues et sortiront en dernier (cf. Figure 26).

10 mL d'échantillon protéique en sortie de colonne de nickel sont injectés sur une colonne Hiload Superdex 75 26/60 (GE healthcare) préalablement équilibrée en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5 mM. La protéine migre au travers de la résine grâce à un flux isocratique du même tampon à un débit de 2,5 mL/min à l'aide d'un système « FLPC AKTA purifier 10 » (GE Healthcare). La totalité de l'élution est collectée par fraction de 5 mL et les fractions correspondant au pic d'intérêt sont récupérées puis analysées sur gel de polyacrylamide.



**Figure 26 : schéma d'une résine de chromatographie d'exclusion ou gel-filtration**

### 3-1-d Gel de polyacrylamide

Cette technique permet la séparation des protéines ou ADN au travers d'un gel à l'aide d'un courant électrique. En condition dénaturante (SDS-PAGE), cette séparation des molécules s'effectue en fonction de la masse moléculaire. En condition native, cette séparation se fera en fonction de la forme, de la taille et de la charge de la molécule.

Les gels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) permettent la séparation des protéines en conditions dénaturantes en fonction de leur taille. Le SDS, détergent ionique chargé négativement interagit avec les charges positives des protéines et leurs régions hydrophobes et forment un écran qui permet de donner une charge globale négative à peu près équivalente pour toutes les protéines, permettant ainsi une migration de celles-ci d'une électrode négative vers une électrode positive au travers d'un gel de polymère d'acrylamide plus ou moins réticulé formant un maillage qui permet la séparation des molécule en fonction de leur taille.

Deux gels de réticulations différentes sont coulés l'un au dessus de l'autre : le gel de séparation comportant un pourcentage d'acrylamide de 12 ou 14 % (tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,5, SDS 0,1%) selon les besoins est d'abord coulé entre deux plaques de verre (système miniprotean 3 de BioRad) puis, après solidification de celui-ci, un gel de concentration à 4 % d'acrylamide (Tris-HCl 100 mM pH 6,5, SDS 0,1%) est coulé en présence d'un peigne et permet la formation des puits de dépôt des échantillons.

Les échantillons protéiques dans lesquels du tampon de type Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 3%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,0025 mg/mL) a été ajouté (Laemmli, 1970) sont ensuite déposés dans chaque puits après avoir été chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Un mélange de marqueurs de poids moléculaire est déposé dans l'un des puits afin de faciliter l'analyse du gel par la suite.

Un courant de 90V pendant 5-10 minutes puis 180 V est appliqué. La migration est arrêtée lorsque la migration du Bleu de Bromophénol ajouté au tampon Laemmli atteint le bas du gel. Les gels sont ensuite récupérés, lavés à l'eau distillée puis trempés dans une solution de bleu de Coomassie G250 (éthanol 30%, acide acétique 10%, bleu de Coomassie G250 0,25% (W/V)).

### 3-2 Préparation des ribosomes

Les ribosomes sont préparés à partir d'une culture de *Bacillus subtilis* en milieu LB ayant poussé jusqu'à une D.O. de 0,6 à 600nm.

Les bactéries sont sédimentées par centrifugation 20 minutes à 4000 g puis lavées par du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dithiotréitol (DTT) 1 mM. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans ce même tampon supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases « Complete EDTA-free inhibitor cocktail » (Roche) selon les recommandations du fournisseur et de 500 U de Dnase I Rnase-free (Roche). Les cellules sont ensuite lysées par trois passages successifs en presse de French à 1000 psi.

Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 15000 g et 4°C et le surnageant contenant les ribosomes est récupéré et soumis à un gradient continu de sucrose 5-40% en tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, DTT 1 mM.

Les gradients sont ensuite centrifugés 16 h à 200000 g en rotor SW41 de Beckman et à 4°C puis des fractions de 400 µL sont récupérées et la D.O. est mesurée à 254 nm afin d'identifier les fractions comportant les différentes sous-unités du ribosome.

Les fractions correspondantes à chaque sous-unité sont rassemblées et leur concentration est estimée en utilisant les données suivantes :

1 UA 260 nm = 23 pmol de ribosome 70S, 34 pmol de ribosome 50S ou 69 pmol de ribosome 30S.

### 3-3 Tests enzymatiques

Les tests enzymatiques réalisés utilisent un système couplé qui permet d'une part de suivre l'hydrolyse du ligand et d'autre part de régénérer celui-ci afin que sa concentration reste constante et que la réaction enzymatique s'effectue toujours en vitesse initiale. Cela permet également de s'affranchir des effets d'inhibition par le produit de la réaction qui pourraient survenir.

Le système utilisé ici est celui utilisant la Pyruvate Kinase (PK), et la Lactate Déshydrogénase (LDH) – cf. Figure 27.

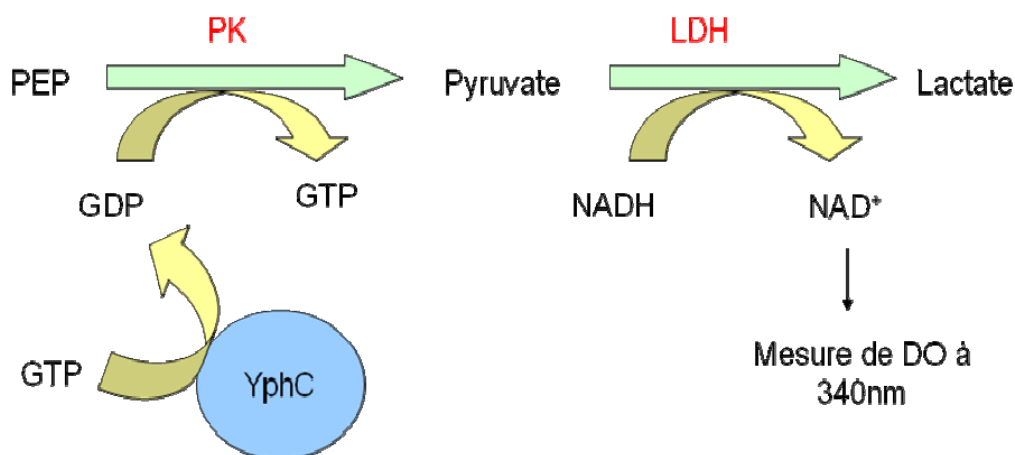


Figure 27 : schéma de fonctionnement du système couplé PK-LDH.

Ainsi, 4 mM NADH, 20 mM de PEP (phosphoenol pyruvate), 15  $\mu$ g de Pyruvate Kinase (PK), 7,5  $\mu$ g de Lactate Déshydrogénase (LDH), 1 mM de  $MgCl_2$  sont mélangés avec une quantité définie de protéine et le tampon de la réaction (ici du Tris-HCl 50 mM pH 8). Le GTP est ensuite ajouté à la réaction. La protéine d'intérêt hydrolyse le GTP en GDP. Le GDP est alors régénéré en GTP grâce à la PK qui transforme de façon concomitante le PEP en pyruvate. Le pyruvate est alors transformé en lactate par la Lactate Déshydrogénase qui oxyde une molécule de NADH (qui absorbe la lumière à 340 nm) en  $NAD^+$  lors de cette réaction. La disparition du NADH est suivie par absorbance à 340 nm. Comme une molécule de GTP hydrolysée correspond à la disparition d'une molécule de NADH, la diminution d'absorbance à 340 nm permet de connaître la quantité de GTP consommée. (cf. Figure 27)

Selon les besoins de l'étude, du KCl est ajouté à la réaction (normalement 30 mM de KCl sont ajoutés systématiquement au système couplé afin de permettre à la Pyruvate Kinase d'être plus efficace).

Les activités enzymatiques sont ensuite déduites par application de la formule dérivée de la loi de Beer-Lambert suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{s} \times \frac{60}{\epsilon_{NADH}} \times \frac{V_r}{Q_p}$$



Où AS est l'activité spécifique de la protéine.

$\frac{\Delta DP}{\Delta t}$  Est la différence d'absorbance à 340 nm par seconde, calculée par différence entre deux instants ou donnée par la pente de la droite obtenue pour chaque cinétique.

$\epsilon_{\text{NADH}}$  est le coefficient d'extinction molaire du NADH

$V_r$  est le volume réactionnel exprimé en litre

$Q_p$  est la quantité de protéine dans la réaction exprime en mg

### 3-4 Spectroscopie de fluorescence

Cette technique utilise les propriétés physico-chimiques des protéines et plus particulièrement des tryptophanes à restituer une fluorescence après excitation par une lumière de longueur d'onde donnée.

Toutes les expériences de fluorescence de ce travail ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre PTI Quanta Master 4 à comptage de photons.

Les protéines sont préalablement dessalées sur colonne PD10 (GE healthcare) et se trouvent en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 pour les expériences de fluorimétrie. Elles sont introduites à raison de 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$  final pour la protéine native ou les domaines séparés respectivement en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, NaCl ou KCl en concentration voulue selon les analyses. Parallèlement, une cuve ne contenant que le tampon, et une cuve contenant le tampon et du N-acétyltryptophanamide (NATA) à 1  $\mu\text{M}$  final sont préparées.

Les cuves sont soumises à un faisceau lumineux de longueur d'onde  $\lambda=295$  nm et la fluorescence est mesurée entre les longueurs d'ondes  $\lambda = 310$  et  $\lambda = 400$  nm. Une solution de nucléotide tamponnée à pH 8 est ensuite ajoutée progressivement à chaque cuve et la mesure de fluorescence est répétée.

Chaque spectre est ensuite traité séparément par soustraction du spectre d'émission de fluorescence du tampon correspondant puis l'aire du pic résultant est intégré pour la protéine et pour le NATA prenant ainsi en compte tout le pic de fluorescence et permettant de s'affranchir de tout décalage du maximum d'émission de fluorescence (le  $\lambda$  max de

fluorescence du tryptophane peut se décaler vers des longueurs d'ondes plus grandes ou plus petites selon son environnement).

Les données sont ensuite traitées mathématiquement : Les niveaux de fluorescence (F) sont normalisés par rapport à la fluorescence initiale (F0) obtenue sur la cuve sans nucléotide. Le rapport F/F0 ainsi obtenu est ensuite comparé à la fluorescence normalisée du NATA :

$$RF = \frac{\frac{F}{F0} \text{ protéine}}{\frac{F}{F0} \text{ NATA}}$$

Les valeurs sont ensuite traitées dans le logiciel Grafit5 (Erithacus software) en appliquant l'équation mathématique suivante:

$$F = F_{\min} + (P + L + Kd) - \sqrt{(L + P + Kd)^2 - 4PL} \times \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{2P}$$

Où F est la fluorescence

$F_{\min}$  le niveau de fluorescence minimum

$F_{\max}$  le niveau de fluorescence maximum

P est la concentration en protéine

L est la concentration en Ligand

Kd est la constante de dissociation de la protéine pour le ligand.

### 3-5 Interaction protéine – ribosomes

La protéine purifiée contenant une étiquette de 6 résidus histidine est mise en contact avec les ribosomes purifiés en proportion équimolaire. Le mélange est incubé 10 minutes à 37°C puis déposé sur un coussin de saccharose à 10%.

Les tubes sont soumis à une ultracentrifugation 1 h à 150000 g, à 4°C. Les tubes sont ensuite récupérés et le culot analysé par séparation en gel d'acrylamide puis immuno-révélation. Les surnageants peuvent être également analysés de la même façon après une précipitation préalable des protéines par la technique DOC-TCA.

### 3-5-a Précipitation des protéines

Certain échantillons sont trop dilués ou dans des volumes trop importants pour permettre un dépôt suffisant et une détection efficace en gel de polyacrylamide. La précipitation des protéines par la méthode DOC-TCA permet de concentrer ces échantillons et de récupérer un maximum de protéine. Cette technique est dénaturante et ne permet pas une étude fonctionnelle ensuite.

L'équivalent de 1/100<sup>e</sup> du volume d'une solution de DOC 2% (déoxycholate) est ajouté à l'échantillon. Les tubes sont homogénéisés au vortex puis incubés dans la glace pendant 30 minutes environ. Du TCA 100% (trichloroacetic acid) est ensuite ajouté à une concentration finale de 10% et les échantillons sont homogénéisés puis incubés à 4°C toute la nuit.

Les tubes sont ensuite centrifugés 10 minutes à 15000 g puis le surnageant est éliminé. Les culots sont lavés par de l'acétone plusieurs fois afin d'éliminer l'acide restant. Les tubes sont ensuite centrifugés à nouveau et le surnageant éliminé.

Les culots sont séchés à l'air et peuvent ensuite être resuspendus dans le volume désiré de tampon de charge Laemmli en ajustant le pH à l'aide de NaOH si celui-ci est trop acide. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel SDS-PAGE.

## **3-6 Immuno-révélation**

Cette technique utilise la spécificité des anticorps pour leur cible. Des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt sont donc utilisés (appelés anticorps primaires). Selon le cas, cet anticorps est couplé à une enzyme qui permet la détection par réaction colorimétrique ou de chimioluminescence. (immuno-détection directe). Dans d'autre cas, cet anticorps dit primaire n'est pas détectable directement et un second anticorps dit secondaire, couplé à une enzyme

(dans notre travail cette enzyme couplée est toujours la peroxydase) permet la révélation par une réaction chimique produisant une molécule colorée ou une molécule luminescente (souvent le cas pour la peroxydase).

### 3-6-a Transfert

Après électrophorèse des protéines, le gel d'acrylamide est incubé 10 minutes dans le tampon de transfert ( Tris-HCl 25 mM pH 8, glycine 192 mM, méthanol 10%, SDS 0,005%), puis le gel est mis en contact direct avec une membrane PVDF Immobilon-P (Millipore) préalablement activée en méthanol 100% pendant quelques secondes puis incubée dans le tampon de transfert. Le gel et la membrane sont placés dans un système de transfert liquide (BioRad) entre des tampons de mousse et morceaux de papier Wathman imbibés de tampon de transfert. Un courant de 100 V est ensuite appliqué pendant 1 h afin de transférer les protéines contenues dans le gel sur la membrane. Le système est refroidi par de la glace.

### 3-6-b Immuno-détection : Western Blot

Les membranes portant les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide sont plongées dans une solution de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1% (tampon TBST), BSA (bovine serum albumin) 10 mg/mL pendant 1 h à température ambiante, sous agitation. La BSA en grande quantité va se fixer à la membrane libre (non occupée par les protéines transférées), saturant la membrane en tout point afin que les anticorps utilisés ultérieurement se fixent spécifiquement sur leur cible.

Les membranes sont ensuite lavées trois fois 5 minutes en tampon TBST puis mises en contact avec la sonde West pico His-probe de Perbio diluée 5000 fois dans ce même tampon.

Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 5 minutes en TBST et mise en contact avec le substrat luminescent ECL de Perbio pendant 5 minutes. Les membranes sont égouttées puis exposées en cassette à des films photographiques pendant le temps nécessaire à la détection du signal (quelques minutes en général). Les films sont ensuite révélés par trempage dans des bains de révélateur (kodak), eau et fixateur (kodak) en chambre noire.

### 3-7 Thermal Shift Assay (TSA)

Cette technique permet de suivre la dénaturation induite par une augmentation de température d'une protéine. Cette dénaturation est rapportée par une sonde fluorescente le orange SYPRO qui va se fixer aux parties hydrophobes de la protéine au fur et à mesure de sa dénaturation et ainsi augmenter sa fluorescence. Cette augmentation de fluorescence est suivie en temps réel et permet ensuite de définir une température de  $\frac{1}{2}$  dénaturation :  $T_m$

La protéine est diluée en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une concentration finale de 0,5 mg/mL. Elle est ensuite introduite dans les puits d'une microplaque 96 puits à raison de 2  $\mu$ L par puits pour un volume final de 25  $\mu$ L (Soit 1  $\mu$ g d'YphC par puits).

La sonde Orange SYPRO est diluée 5 fois à partir de la solution mère et 2  $\mu$ L de cette préparation sont ajoutés à chaque puits. Le volume est ensuite complété à 25  $\mu$ L par ajout du tampon d'intérêt.

Dans notre cas, nous avons testé : les concentrations en KCl et NaCl ainsi que la nature et/ou la concentration du nucléotide : GDP, GMPPNP, GDP AlF<sub>x</sub>. Dans le cas de l'étude de l'effet du nucléotide sur le  $T_m$  de la protéine, les expériences ont été menées avec une concentration finale de 1 mM de nucléotide par puits. Après homogénéisation et élimination des bulles éventuellement présentes, les plaques sont placées dans un appareil de détection IQ5 de BioRad et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel « BioRad IQ5 » fourni.

# RESULTATS



## **1-Production et purification de la protéine**

YphC est une protéine de *B. subtilis*, bactérie à Gram +. Pour l'étudier, nous l'avons surproduite dans une souche bactérienne d'*E. coli*, bactérie à Gram -. Pour cela, nous avons amplifié le gène par PCR, à partir de l'ADN génomique de *B. subtilis*, puis nous avons introduit ce gène dans un vecteur d'expression pET15b, insérant ainsi une étiquette de 6 résidus histidine en N-terminal de la protéine afin de faciliter, par la suite, sa purification.

### **1-1 Protéine native**

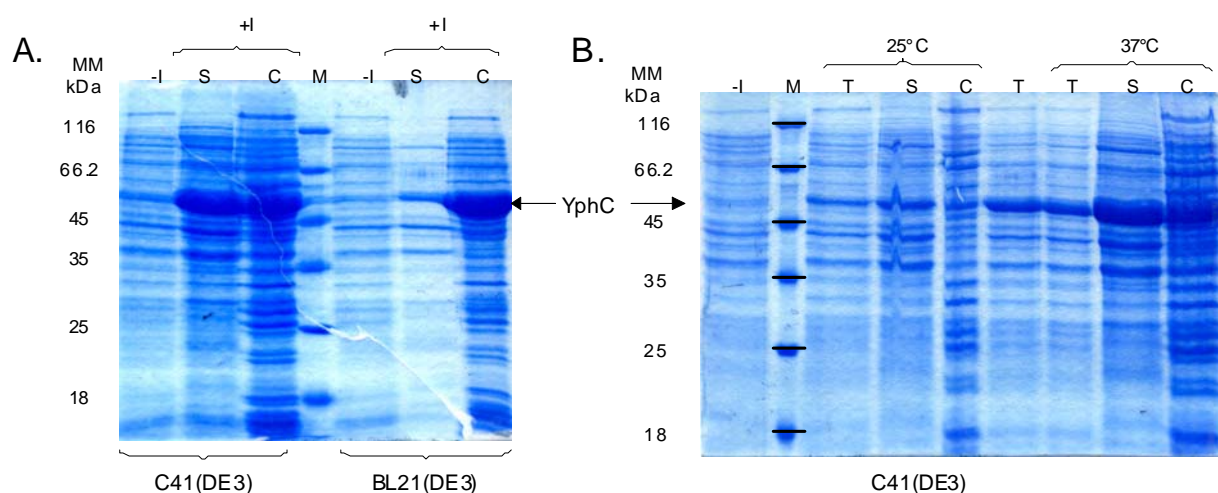
YphC est une protéine du cytoplasme. La production massive de protéine peut parfois engendrer un mauvais repliement ou une mauvaise conformation de la protéine, souvent liés à une production trop importante ou trop rapide de la protéine dans la cellule. La protéine surproduite se retrouve alors dans la fraction non soluble ou corps d'inclusion. Ces problèmes peuvent être surmontés en modifiant la température d'induction, le milieu de culture ou encore la souche bactérienne utilisée. Il convient donc de définir au préalable les conditions optimales de production, en réalisant des tests rapides, dans de petits volumes de culture. Dans un premier temps, nous avons testé des conditions dites standard au laboratoire : Souche *E. coli* BL21(DE3), milieu LB, 37°C et induction par ajout de 1 mM d'IPTG.

#### **1-1-a Tests de solubilité**

Les tests réalisés en *E. coli* BL21(DE3) montrent que la protéine est retrouvée majoritairement dans le culot, c'est à dire dans la fraction non soluble (cf. figure 28A). Des tests supplémentaires dans différents milieux (Turbo Broth, 2YT...) ou à une température d'induction plus basse (25°C) n'ont pas permis d'améliorer ce résultat. Nous avons donc testé d'autres souches bactériennes. La souche *E. coli* C41(DE3), mutant ponctuel de la souche BL21(DE3) décrite dans la littérature comme favorisant la surexpression des protéines membranaires et des protéines globulaires (Miroux et Walker, 1996) a permis d'obtenir une plus grande quantité de YphC dans la fraction soluble (cf. figure 28A). Il semble qu'une



bande apparaisse dans l'échantillon avant induction qui pourrait correspondre à YphC, révélant une fuite du promoteur. Pour réprimer le promoteur avant l'induction nous avons introduit dans le milieu de culture 1% de glucose et nous avons essayé d'induire la surproduction à une température plus basse : 25°C (cf. figure 28B).



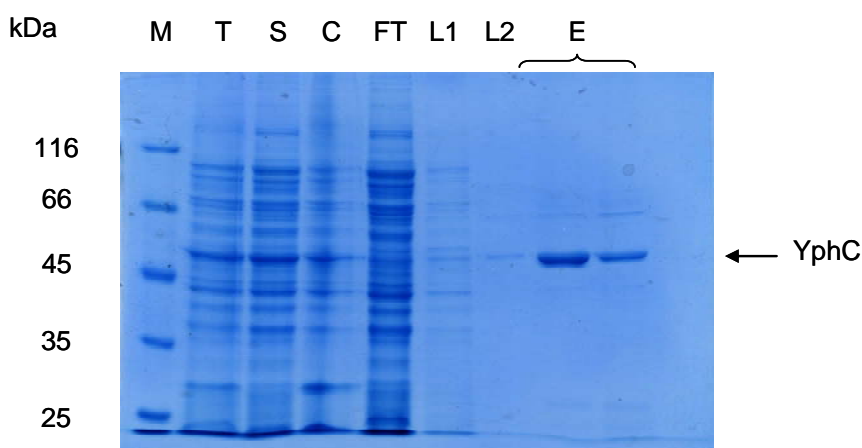
**Figure 28 : tests de solubilité de YphC.** -I : échantillon non induit ; +I : échantillons induits ; T : lysat total ; S : surnageant ; C : culot ; M marqueur de poids moléculaire, MM kDa : masse moléculaire en kilo Dalton. A. tests d'induction en BL21(DE3) et C41(DE3) à 37°C. B. comparaison de solubilité en C41(DE3) après une induction à 25°C ou à 37°C.

L'ajout de glucose a permis de faire disparaître la bande que nous voyions précédemment et de mieux contrôler l'expression de la protéine. L'induction à 25°C, en revanche, n'a pas permis d'enrichir la fraction soluble en YphC. Nous estimons à environ 50% la quantité de YphC surproduite se trouvant dans la fraction soluble. La protéine semble être exprimée de façon abondante et les quantités obtenues sont donc suffisantes pour les études *in vitro*. Nous avons donc utilisé ces conditions pour la surproduction de la protéine : souche C41(DE3), milieu LB supplémenté de 1% glucose et de 100 µg/mL d'ampicilline, induction à 1 mM IPTG à 37°C.

### 1-1-b Surproduction et purification

La production en masse de la protéine se fait dans au moins 1L de milieu de culture LB-glucose 1%-ampicilline 100 µg/mL. Les bactéries sont ensuite récupérées et lysées comme décrit dans la partie « matériel et méthode » puis la protéine portant une étiquette de 6 histidines est purifiée sur colonne d'affinité.

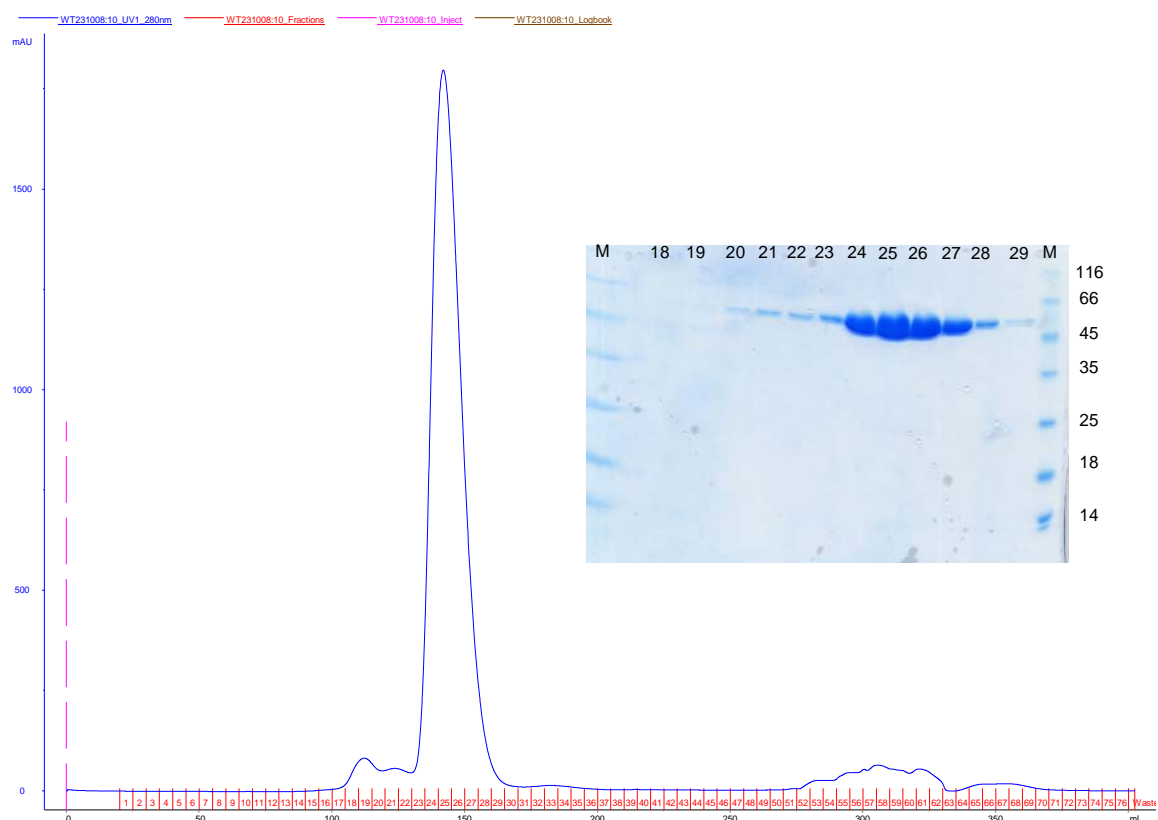
Après élution de la colonne de nickel, la première étape de purification est vérifiée par gel de polyacrylamide (cf. Figure 29).



**Figure 29 : purification de YphC sur colonne de nickel. M : marqueur de taille, T : lysat total, S : surnageant, C: culot, FT : Flow Through- fraction ne se fixant pas sur la résine ; L1, L2 : 1er et 2<sup>e</sup> lavage respectivement, E : élution en présence de 250 mM d'imidazole.**

Il reste quelques contaminants après la colonne d'affinité. Une étape de gel filtration a donc été ajoutée pour tenter d'éliminer les contaminants restant. Après passage en colonne superdex G75, à l'aide d'un système de chromatographie Akta purifier10 (GE healthcare), un aliquote de chaque fraction est récupéré et déposé sur gel de polyacrylamide 12% (cf. Figure 30). Les fractions correspondant à la protéine sont rassemblées. La protéine est concentrée à l'aide d'un concentrateur Vivaspinn à membrane PES dont la limite d'exclusion est de 30 kDa. Cette étape de concentration peut parfois entraîner une précipitation importante de la protéine, et nous n'avons pas été capables d'obtenir un échantillon protéique concentré à plus de 5 mg/mL dans ces conditions. Nous avons testés plusieurs tampons de purification différents

pour essayer de contourner ce problème de stabilité lié à la concentration de la protéine (Hepes/KOH, potassium phosphate), mais nous avons finalement conservé ces conditions de purification pour des raisons qui seront exposées plus loin. Les rendements de purification de la protéine native varient de 50 à 80 mg de protéine pure/L de culture selon l'expérience.



## 1-2 Mutants

YphC possède deux domaines GTPases et un domaine C-terminal additionnel de type KH. Pour étudier et caractériser la protéine au niveau enzymatique, nous avons choisi de générer un certain nombre de mutants permettant d'inactiver, d'altérer ou de séparer les différents

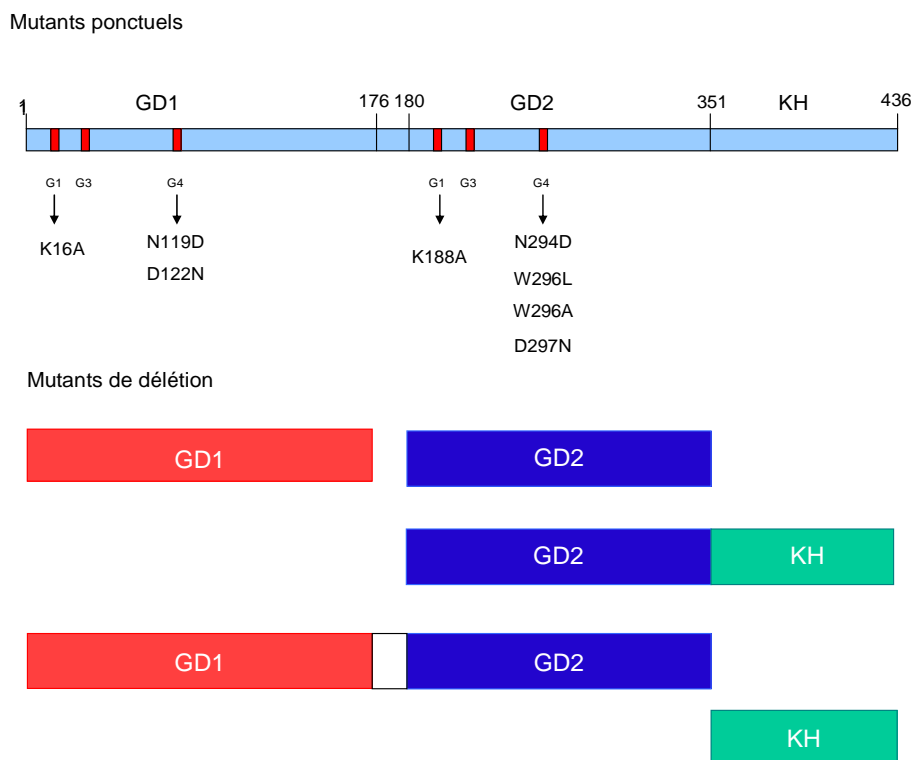
domaines. Nous avons donc généré des mutants ponctuels au niveau des motifs spécifiques des GTPases (cf. Figure 31).

Ainsi les mutants ponctuels pour la lysine conservée du motif A de Walker ont été générés au niveau de chaque domaine G (YphC K16A et YphC K188A). Cette lysine est impliquée dans l'interaction avec le nucléotide au niveau des phosphate  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide (Bourne *et al.*, 1991), et la mutation de cette lysine est connue pour inhiber l'hydrolyse du nucléotide chez les NTPases à P-loop (Saraste *et al.*, 1990).

Nous avons également réalisé la mutation de l'asparagine en aspartate ainsi que l'aspartate en asparagine au niveau du motif G4 (YphC N119D, YphC N294D, YphC D122N et YphC D297N). Ces mutations sont sensées empêcher la fixation du GTP dans le site ou bien de modifier la spécificité de la protéine pour le nucléotide (Bourne *et al.*, 1991; Shan et Walter, 2003). La double mutation de l'aspartate en asparagine a également été réalisée (YphCD122N-D297N).

L'acide aminé variable dans le motif G4 (NKXD) du domaine 2 chez EngA est systématiquement un tryptophane. Nous avons donc choisi de le muter en alanine ou en leucine afin de transformer ce motif en l'équivalent du motif trouvé au niveau du domaine 1 (NKLD) (YphC W296A ou YphC W296L) et voir si cet acide amine est impliqué de quelque façon dans les mécanismes réactionnels de la protéine.

Enfin des mutants de délétion ont été générés : GD1 seul, GD2 seul, KH seul, YphCΔKH (aussi appelé GD1-GD2), YphCΔGD1 (que nous appellerons par la suite GD2-KH).



**Figure 31 : schéma des mutants de YphC générés**

Des tests de solubilité ont été réalisés sur ces mutants de la même façon que pour la protéine native. Pour tous les mutants obtenus sous forme soluble, la purification se fait ensuite dans les mêmes conditions que la protéine native. Après gel filtration toutes les protéines sont homogènes à environ 99%

Trois mutants n'ont pour l'instant pas été obtenus dans la fraction soluble : YphC N294D, GD2 seul et KH. Pour ces mutants, différentes souches bactériennes ont été testées, différentes températures d'induction, différents milieux de culture et même différents pH de tampon de lyse en présence ou en absence de sels. Aucune condition n'a permis d'obtenir les protéines dans la fraction soluble de façon significative. Nous avons donc écarté ces mutants.

Les autres mutants ont été obtenus dans les mêmes conditions que la protéine native. Dans tous les cas, le B-Per utilisé pour lyser les bactéries était composé de tampon Tris-HCl pH 8. La surproduction et purification en masse a été réalisée en tampon Tris-HCl pH 8 en présence de sels.

Les mutations ponctuelles ont également été générées sur les mutants de délétions. Pour l'instant seul le mutant de la lysine catalytique du premier domaine (GD1K16A) a été obtenu

sous forme soluble. Les autres mutants des domaines isolés ont jusqu'à présent toujours été retrouvés dans la fraction non soluble.

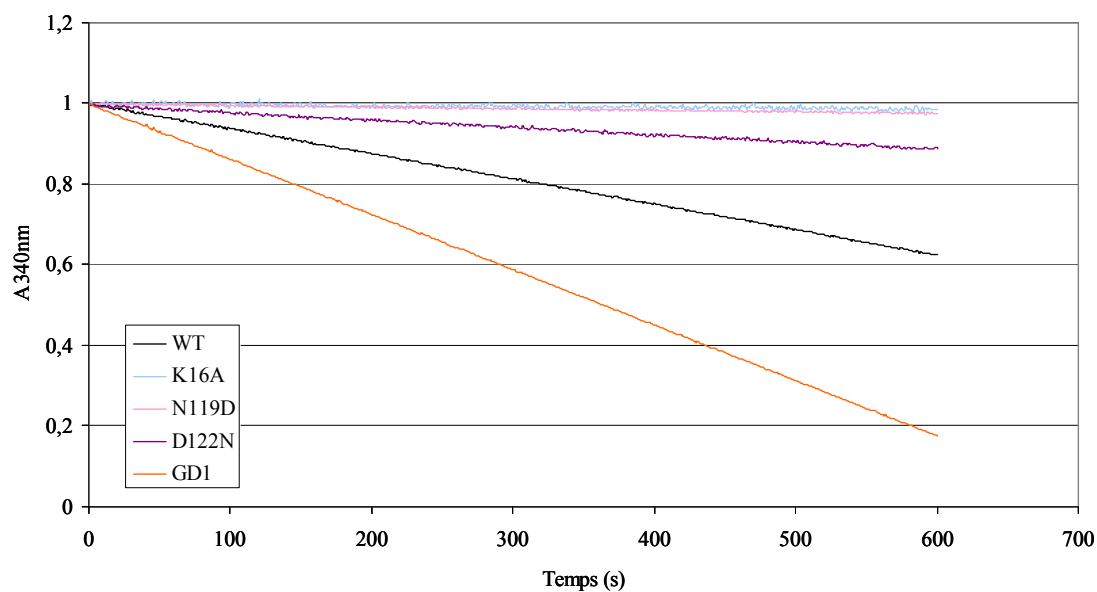
## **2-Tests fonctionnels**

Pour étudier la protéine, il faut que celle-ci soit correctement repliée et fonctionnelle. Si récupérer la protéine dans la fraction soluble est, en général, un bon indicateur d'un repliement convenable, ce n'est pas un argument suffisant. Un test fonctionnel rapide est nécessaire. YphC est une GTPase bactérienne et doit donc hydrolyser le GTP. La fonctionnalité des protéines est donc vérifiée en effectuant une réaction d'hydrolyse du GTP à 1 mM et 75 µg de protéine pour 750 µL de volume réactionnel. (cf. Figure 32).

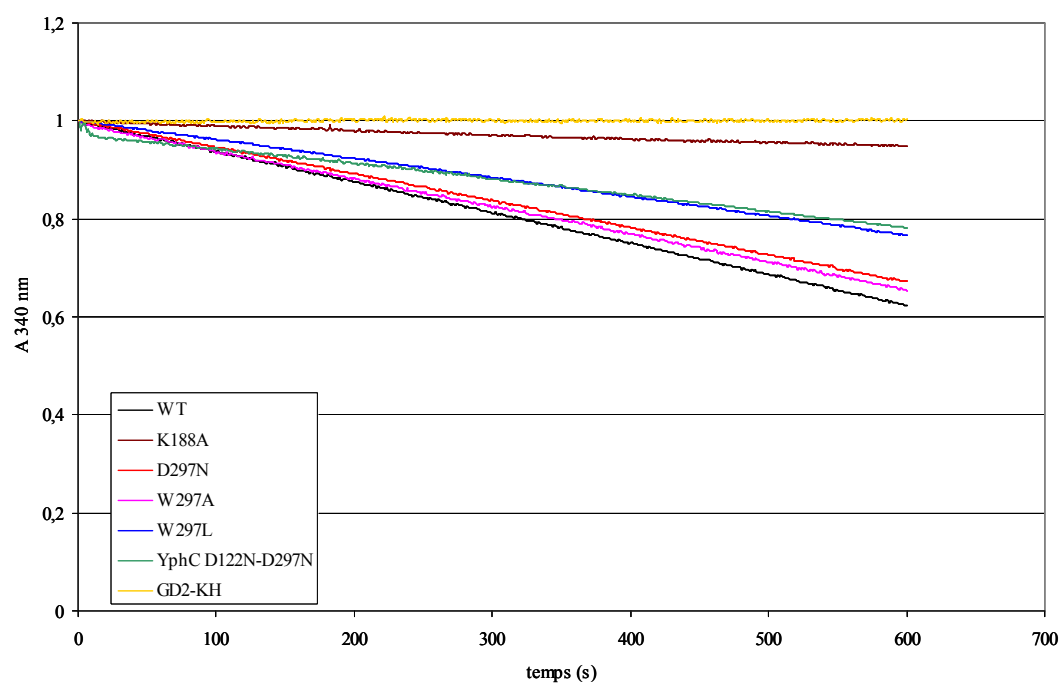
De manière globale, YphC WT est active et les mutants D297N, K188A, W296A, W296L, le double mutant D122N-D297N (cf. Figure 32B) ainsi que le mutant de délétion GD1 le sont également. Le mutant D122N présente une activité très faible et les mutants K16A, N119D et GD2-KH semblent être inactifs (cf. Figure 32A).

Certaines mutations entraînent une perte totale ou partielle de l'activité GTPase. Ceci confirme que l'activité mesurée est bien liée à la protéine sauvage et non à un contaminant éventuel qui présenterait une activité d'hydrolyse du GTP élevée.

A.



B.



**Figure 32 : tests d'activité GTPase d'YphC et de ses mutants. Les tests sont effectués à 37°C, pH 8. Les cinétiques sont normalisées et corrigées par le témoin sans GTP pour être superposées. A. test de fonctionnalité de YphC et des mutants du 1<sup>er</sup> domaine G. B. YphC et mutants du 2<sup>ème</sup> domaine G.**

### **3-Caractérisation biochimique**

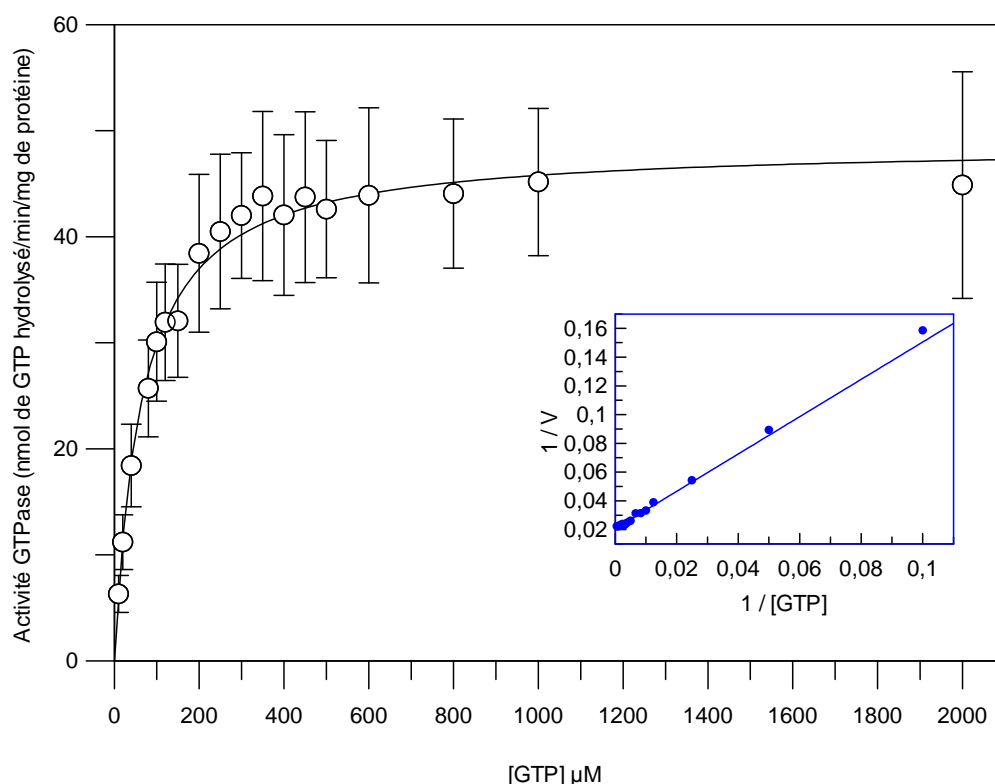
YphC est une enzyme qui hydrolyse le GTP en GDP. A ce titre, la caractérisation biochimique d'une telle protéine passe par une étude enzymatique. Chaque enzyme est caractérisée par ses constantes cinétiques : l'activité spécifique, l'affinité pour le substrat et le produit de la réaction, les constantes d'association et dissociation. YphC a la particularité de présenter deux domaines GTPase en tandem. Comment ces deux domaines agissent et interagissent, sont ils coopératifs ou dissociés, sont ils équivalents ou non, sont autant de questions qu'il convient d'élucider. Pour essayer d'y répondre, nous avons utilisé différentes techniques spectroscopiques.

#### **3-1 YphC WT**

##### **3-1-a Etudes cinétiques**

La protéine native purifiée, étiquetée 6 histidines, est active comme nous l'avons vu. Pour déterminer ses paramètres cinétiques, nous avons utilisé la même technique que pour les tests de fonctionnalité mais en faisant varier la concentration en substrat. Pour chaque concentration de GTP, l'activité est calculée et la relation d'Henri-Michaelis et Menten peut alors être appliquée. On obtient ainsi les courbes présentées en Figure 33.





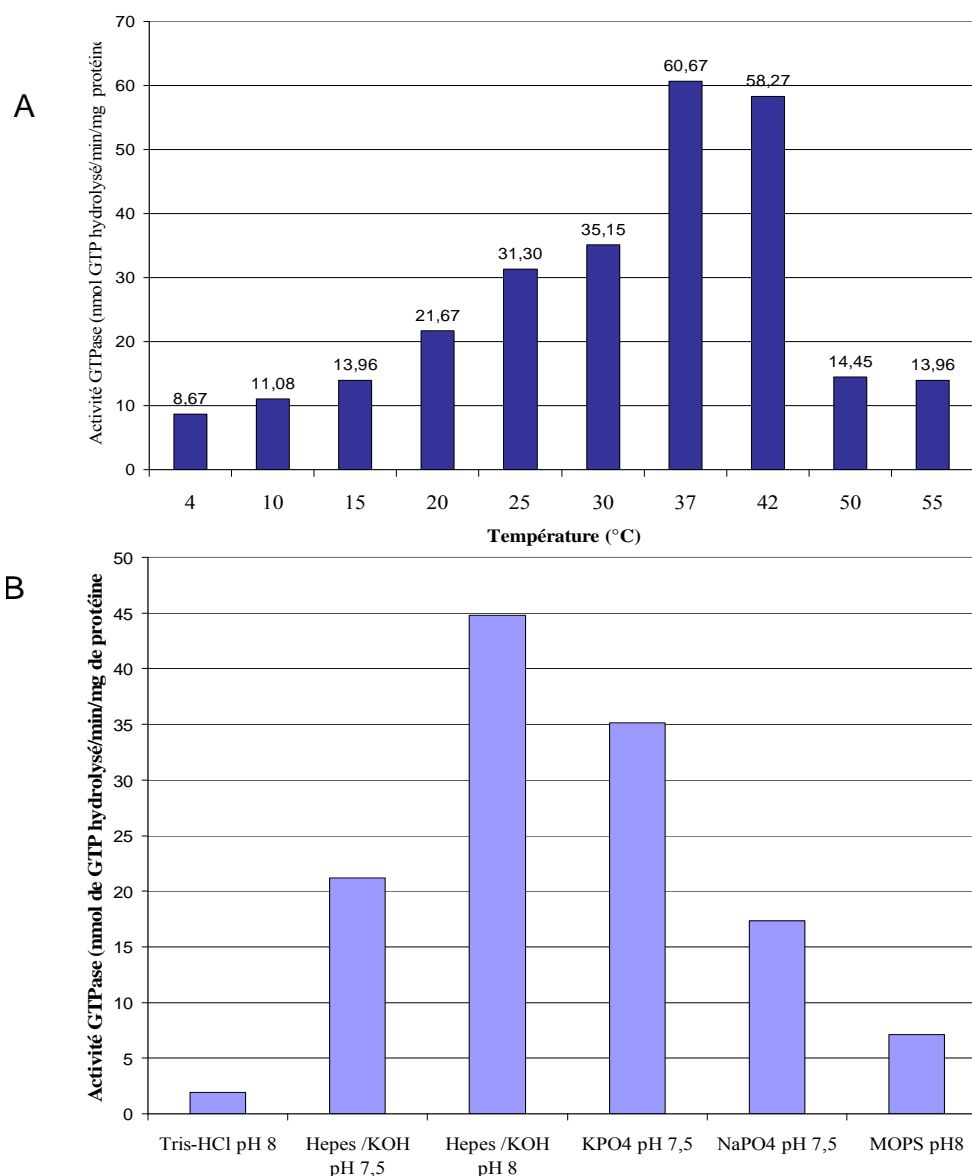
**Figure 33 : activité enzymatique de YphC WT en HEPES/KOH pH 8. Représentation directe  $V = f([S])$ , les valeurs représentent la moyenne calculée à partir de 5 expériences différentes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard calculée sur ces moyennes par le logiciel Grafit 5. En encart : représentation en double inverse de Lineweaver et Burk, avec  $1/[GTP]$  en  $\mu M^{-1}$  en abscisse, et  $1/V_m$  en  $min.mg/nmol.$  .**

On calcule alors un  $K_m$  de  $67 \mu M$  et un  $V_{max}$  de  $56 \text{ nmol/min/mg}$ , soit un  $k_{cat}$  de  $2,85 \text{ min}^{-1}$ .

En premier lieu, on peut noter que les valeurs expérimentales répondent à un modèle enzymatique correspondant à une enzyme de type Michaelienne, à un seul domaine ou bien à deux domaines équivalents. La représentation en double inverse de Lineweaver et Burk ne présente pas de courbure, suggérant qu'il n'y a pas de coopérativité entre les deux sites.

Au cours des différentes expériences réalisées pour reproduire les résultats, nous avons constaté une variabilité dans les valeurs obtenues notamment au niveau du  $V_{max}$  et même au niveau des tests fonctionnels. Nous nous sommes alors demandé pourquoi, d'une préparation à l'autre, nous avions autant de différences notamment lorsque nous avons tenté d'obtenir une protéine plus stable en changeant de tampon de purification par du tampon phosphate ou HEPES/KOH (comme évoqué dans le paragraphe purification). J'ai alors cherché à savoir si les conditions de réactions étaient optimales pour la protéine et j'ai ainsi réalisé des tests à

différentes températures et dans différents tampons afin de mieux comprendre l'influence de ces paramètres sur l'activité de la protéine. (cf. Figure 34).



**Figure 34 : tests enzymatiques réalisés dans différentes conditions: A : tests d'activité enzymatique à différentes températures. B activité enzymatique dans différents tampons. Ces tests sont toujours réalisés en présence de système couplé contenant 30mM de KCl.**

Nous constatons donc que l'activité optimale de la protéine est obtenue à 37°C (cf. Figure 34A) en tampon Hepes/KOH pH 8. On voit également que l'activité est très faible en tampon Tris ou MOPS pH 8, et qu'elle varie selon le tampon utilisé : phosphate ou Hepes/KOH et selon le pH du milieu de mesure : pH 7,5 ou pH 8 (cf. Figure 34B). Des tests d'activité à

différents pH (non montrés) compris entre 6 et 9 ont montrés que l'activité variait peu ou pas et ces variations ne suffissent pas à expliquer les grandes différences que nous voyons ici.

La protéine Der de *Thermotoga maritima* a été décrite comme étant une GTPase activée par le potassium (Hwang et Inouye, 2001). Un des paramètres qui varie dans ces tests est la quantité de potassium dans chaque cuve. En effet, le système couplé nécessite 30 mM de KCl pour fonctionner de façon optimale, les tampons Tris, MOPS ou sodium phosphate ne contiennent pas de potassium et les tampons potassium phosphate et Hepes/KOH ont une concentration en potassium qui varie selon le pH utilisé. Si on calcule les concentrations de potassium dans les différents tests réalisés en tampons Hepes/KOH ou potassium phosphate les concentrations finales en potassium s'étalent entre 35 mM et 65 mM de potassium environ.

Nous avons donc décidé d'étudier plus en détail cet effet du potassium sur la protéine afin de mieux comprendre son action sur la protéine, définir si celui ci peut jouer un rôle de régulateur de la protéine et harmoniser les conditions de réactions pour ensuite pouvoir comparer convenablement les résultats obtenus sur les différentes protéines.

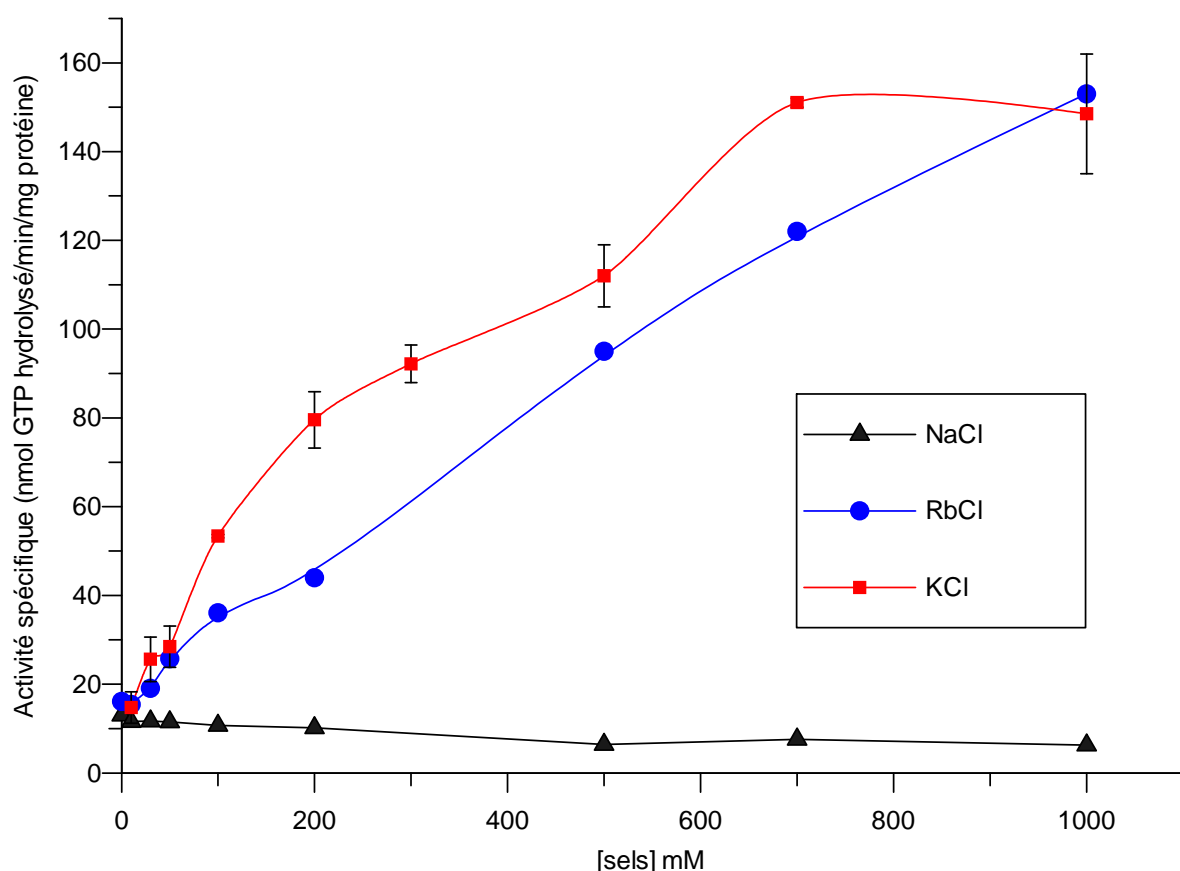
C'est pourquoi nous avons décidé de purifier la protéine en tampon Tris-HCl pH 8 de façon systématique, et d'utiliser ce tampon pour tous les tests enzymatiques et mesures de fluorescence. En effet, ce tampon ne comporte ni sodium ni potassium et nous permet de contrôler totalement les concentrations de ces deux ions dans les expériences.

### **3-2 Effet du Potassium**

#### 3-2-a étude par enzymologie

Pour caractériser l'effet du potassium sur l'activité de la protéine, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment mais en dessalant la protéine sur colonne PD10 (GE Healthcare) contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 et en ôtant complètement le potassium des expériences. Du KCl a ensuite été ajouté de façon croissante. Pour s'affranchir des effets potentiels de la force ionique, nous avons mené les mêmes expériences en présence de NaCl. D'autres composés de la famille des métaux alcalins ont été également testés : le rubidium, et le lithium. Un test en présence de calcium a également été réalisé.

On obtient ainsi des courbes d'activités en fonction de la concentration en sels (cf. Figure 35).



**Figure 35 : effets des sels sur l'activité enzymatique d'YphC à 37°C et 1 mM de GTP. L'expérience en présence de KCl représente une moyenne de trois expériences et les barres d'erreur mentionnées représentent l'erreur standard calculée sur ces moyennes par le logiciel Grafit 5 (Erithacus software).**

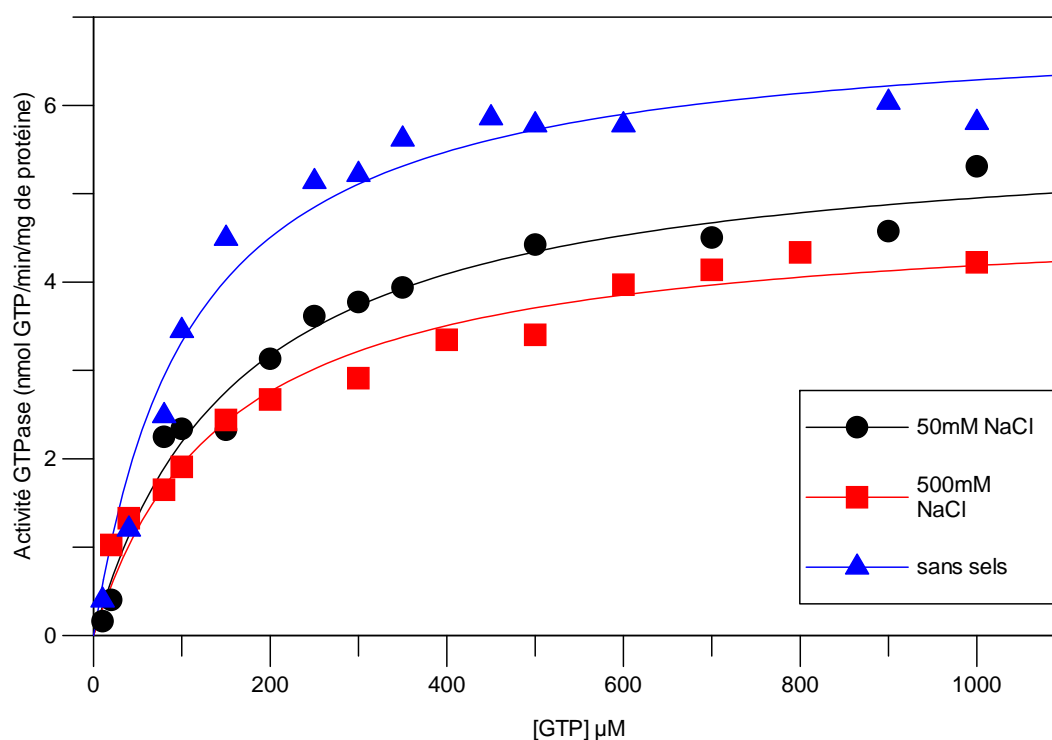
On voit que l'activité d'hydrolyse du GTP est activée en présence de potassium et qu'elle l'est également en présence de rubidium. Le sodium, par contre, n'active pas la protéine et on enregistre même une légère inhibition à forte concentration. Les essais en présence de chlorure de lithium ou chlorure de calcium ont entraîné une précipitation de la protéine et/ou du système couplé même à faible concentration.

Il y a donc bien une activation spécifique de YphC par le potassium, même à faible concentration. Ainsi 30 mM de potassium suffisent à augmenter de deux à trois fois l'activité spécifique de la protéine et à une concentration de 500 mM, on enregistre une activation de

près de 10 fois par rapport à l'activité en absence de potassium. Des résultats semblables sont retrouvés lorsque le potassium est remplacé par le rubidium.

L'activation par le potassium a été montrée pour Der de *Thermotoga maritima* (Hwang et Inouye, 2001). Elle n'a toutefois pas été caractérisée plus en détail et l'activation obtenue semble moins importante que dans notre cas.

Nous avons donc ensuite étudié les constantes cinétiques dans différentes conditions de sels.



**Figure 36 : cinétiques enzymatiques à différentes concentrations de NaCl. Détermination des constantes cinétiques  $K_M$  et  $V_m$ . En bleu: absence de sels, en noir 50 mM NaCl et en rouge 500 mM NaCl.**

En absence de sels, une activité très faible de la protéine est mesurée avec un  $V_{max}$  d'environ 7 nmol/min/mg, et un  $K_M$  d'environ 120  $\mu M$ . En présence de NaCl à faible ou forte concentration (50 ou 500 mM), on mesure la même activité avec des constantes cinétiques équivalentes à celle mesurée en absence de sels. (5,7 et 163  $\mu M$  à 500 mM et 4,8 et 148  $\mu M$  à 50 mM). La force ionique n'a donc aucun effet sur l'hydrolyse du nucléotide. On note toutefois que, dans ces conditions, l'activité hydrolytique étant très faible, les résultats obtenus varient de manière importante d'une expérience à l'autre (cf. Figure 36).

En présence de potassium, en revanche, on constate une augmentation du  $V_{\max}$  dépendante de la concentration en potassium (cf. Figure 37). Ainsi on mesure un  $K_M$  de 140-150  $\mu\text{M}$  pour des concentrations de 300 et 500 mM de KCl alors qu'il est mesuré à 85  $\mu\text{M}$  à 30 mM KCl. Le  $V_{\max}$  quant à lui est de 150 nmol/min/mg à 300 et 500 mM de potassium et de 25 nmol/min/mg à 30 mM. Comparées à l'activité en absence de sels, nous obtenons effectivement une activation de près de 30 fois à 500 mM KCl ou 300 mM et de 4 à 10 fois à 30 mM de potassium (cf. Figure 37 et Tableau 2). Le  $K_M$  en revanche varie peu et cette variation ne peut être considérée comme significative.

Le potassium agirait comme un activateur non essentiel de YphC en accélérant l'hydrolyse du GTP sans affecter l'affinité.

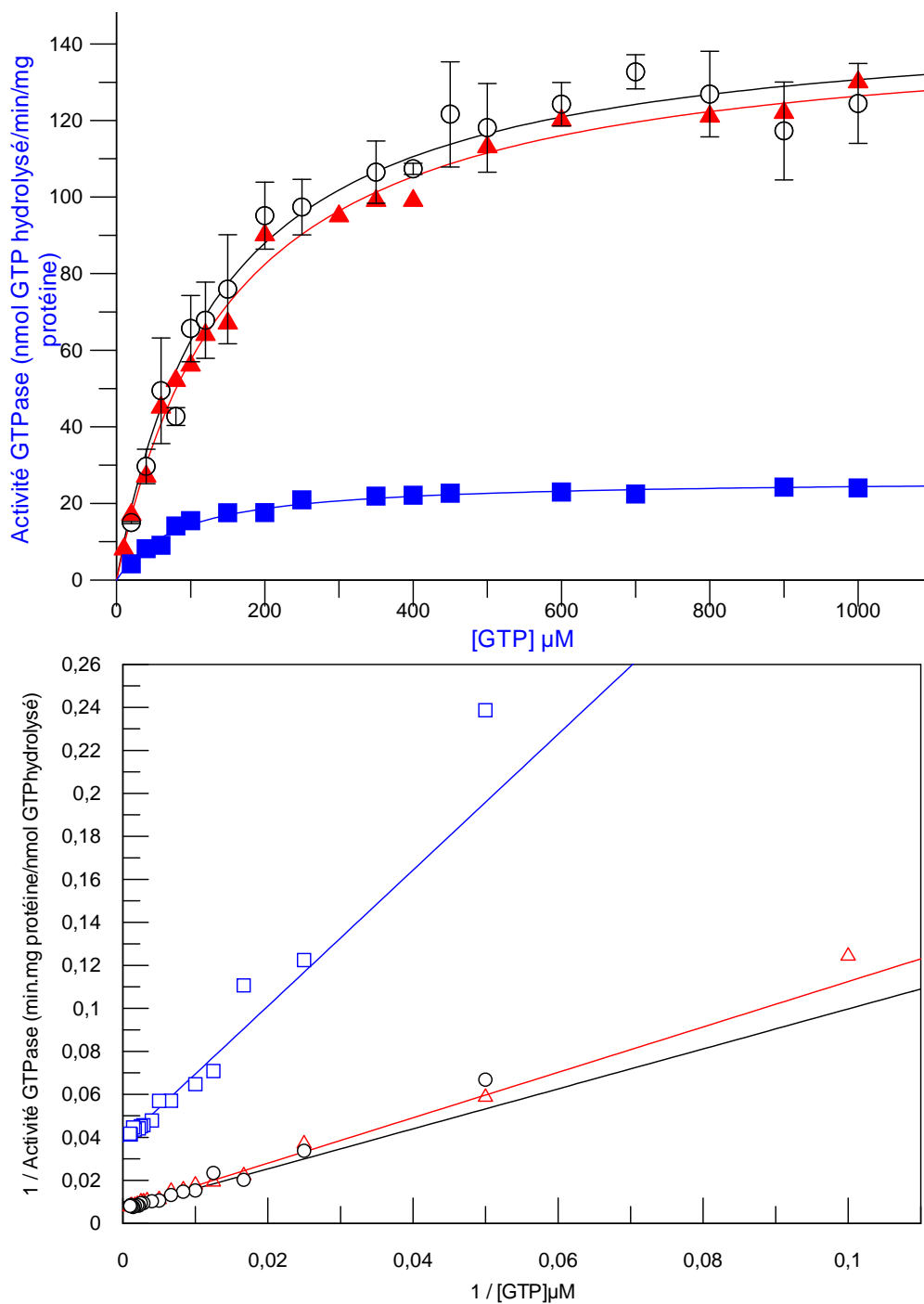


Figure 37 : cinétiques enzymatiques à 37°C-Détermination des constantes cinétiques en présence de différentes concentration de KCl. En bleu : 30 mM KCl , en rouge 300 mM KCl et en noir 500 mM KCl.

| Sel         | concentration | $K_M$ ( $\mu$ M) | $V_m$ (nmol GTP/min/mg de protéine) | $k_{cat}$ (1/min) |
|-------------|---------------|------------------|-------------------------------------|-------------------|
| $\emptyset$ |               | 120              | 7                                   | 0,35              |
| NaCl        | 50mM          | 148              | 4,8                                 | 0,24              |
|             | 500mM         | 163              | 5,7                                 | 0,29              |
| KCl         | 30mM          | 85               | 25                                  | 1,27              |
|             | 300mM         | 140              | 150                                 | 7,6               |
|             | 500mM         | 150              | 150                                 | 7,6               |

Tableau 2 : récapitulatif des valeurs de  $K_M$  et  $V_m$  trouvées pour YphC WT3-2-b Etude par fluorescence

Le  $K_M$  mesuré par les approches cinétiques ne donne qu'une idée approximative de l'affinité pour le substrat. Pour mesurer les valeurs des constantes de dissociation du substrat, le GTP ou du produit, le GDP, nous avons étudié la fixation des nucléotides, en présence de magnésium, par fluorescence. Pour vérifier que l'effet du potassium ne joue pas sur l'affinité de la protéine pour les nucléotides, nous avons réalisé ces expériences dans différentes conditions salines. De plus, pour empêcher la réaction d'hydrolyse de se produire, nous avons utilisé un analogue du GTP non hydrolysable : le GMPPNP.

YphC possède deux tryptophanes dans sa séquence chacun dans un domaine nucléotidique. De plus, le tryptophane situé dans le deuxième domaine est très conservé et se situe au niveau du site nucléotidique dans le motif 4.

Nous avons donc suivi la fixation des nucléotides en mesurant les variations de fluorescence des tryptophanes. Pour éviter les interférences liées aux tyrosines et phénylalanines, nous nous sommes placés à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm et mesuré l'émission de fluorescence entre 310 et 400 nm (cf. Figure 38)



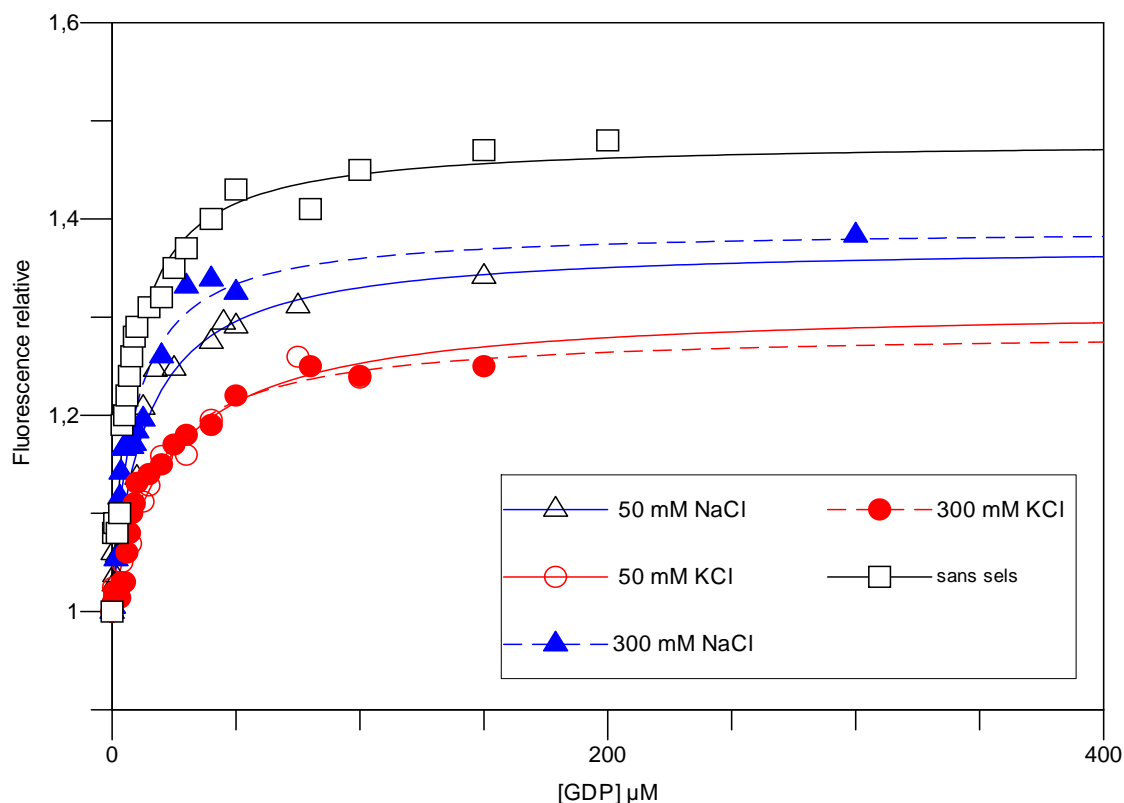


Figure 38 : fixation du GDP sur YphC par mesure de fluorescence du tryptophane. Les valeurs représentent la fluorescence relative de la protéine normalisée par rapport au zéro et corrigée par le témoin de filtre interne.

A partir de ces données, il est possible de calculer les constantes de dissociations pour les nucléotides GDP ou GMPPNP en présence de magnésium. (cf. Tableau 3)

|           |        | GDP                        | GMPPNP                     |
|-----------|--------|----------------------------|----------------------------|
| sans sels |        | 8 $\mu\text{M} \pm 1$      | 25,7 $\mu\text{M} \pm 2,8$ |
| NaCl      | 50 mM  | 13,6 $\mu\text{M} \pm 2$   |                            |
|           | 300 mM | 8,6 $\mu\text{M} \pm 1,7$  | 16,5 $\mu\text{M} \pm 3,7$ |
| KCl       | 50 mM  | 23,6 $\mu\text{M} \pm 4,5$ | 23,7 $\mu\text{M} \pm 4,8$ |
|           | 300 mM | 16,3 $\mu\text{M} \pm 2,3$ | 18,8 $\mu\text{M} \pm 2,8$ |

Tableau 3 : Kd mesurés pour YphC vis à vis du GDP et du GMPPNP en présence de KCl ou de NaCl. Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Grafit5 (Erithacus software) en appliquant l'équation comme précisé dans la partie « matériels et méthodes », pour déduire les valeurs de Kd.

On voit que YphC possède une faible affinité pour les nucléotides, de l'ordre du  $\mu\text{M}$  alors qu'elle est plutôt de l'ordre du  $\text{nM}$  pour les GTPases de la famille de Ras (Gibbs *et al.*, 1984). On note également que l'affinité varie peu selon les conditions salines utilisées (un facteur 2 pour le GDP à 300 mM de sels, ce qui est négligeable).

Le potassium influence donc l'hydrolyse du GTP mais pas la fixation des nucléotides.

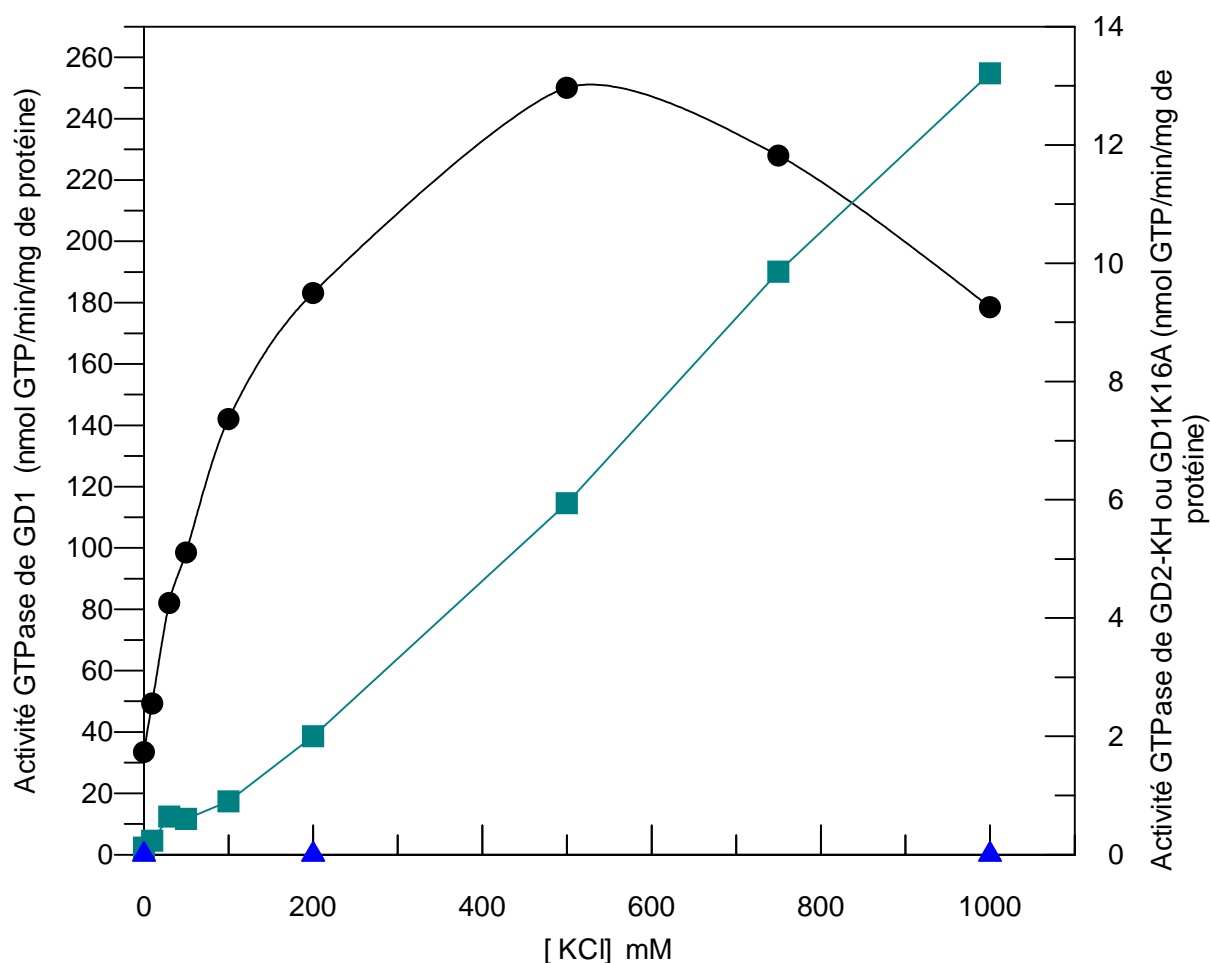
YphC possède deux domaines GTPase en tandem. Dans toutes les expériences effectuées sur la protéine entière, nous n'avons pas pu discerner les deux domaines. Nous avons donc décidé de séparer physiquement les deux domaines afin de les étudier séparément et discriminer leurs activités et caractéristiques cinétiques propres.

### 3-3 Les mutants de YphC

#### 3-3-a Mutants de délétions : GD1, GD2-KH, YphC $\Delta$ KH

On mesure donc l'effet du potassium sur les domaines (cf. Figure 39). On voit tout d'abord que GD1 est très actif en absence de sels (environ 30nmol de GTP hydrolysé /min/mg de protéine) alors que GD2-KH ne l'est pratiquement pas (0,2 nmol de GTP/min/mg de protéine). Toutefois, dans les deux cas, l'hydrolyse du GTP est activée par le potassium. Pour le premier domaine (GD1), cette activité est abolie lorsqu'on mute la lysine catalytique du motif A de Walker (mutant GD1K16A) et l'activation par le potassium n'est alors pas retrouvée. Ceci montre que cette activité importante est bien liée au domaine en lui-même et que l'effet du potassium se fait bien sur la protéine et pas sur un autre composant du milieu réactionnel.

Le mutant équivalent sur GD2-KH n'a pas été obtenu dans la fraction soluble et nous n'avons pas, pour l'instant, été en mesure de faire ces vérifications pour le 2<sup>ème</sup> domaine.



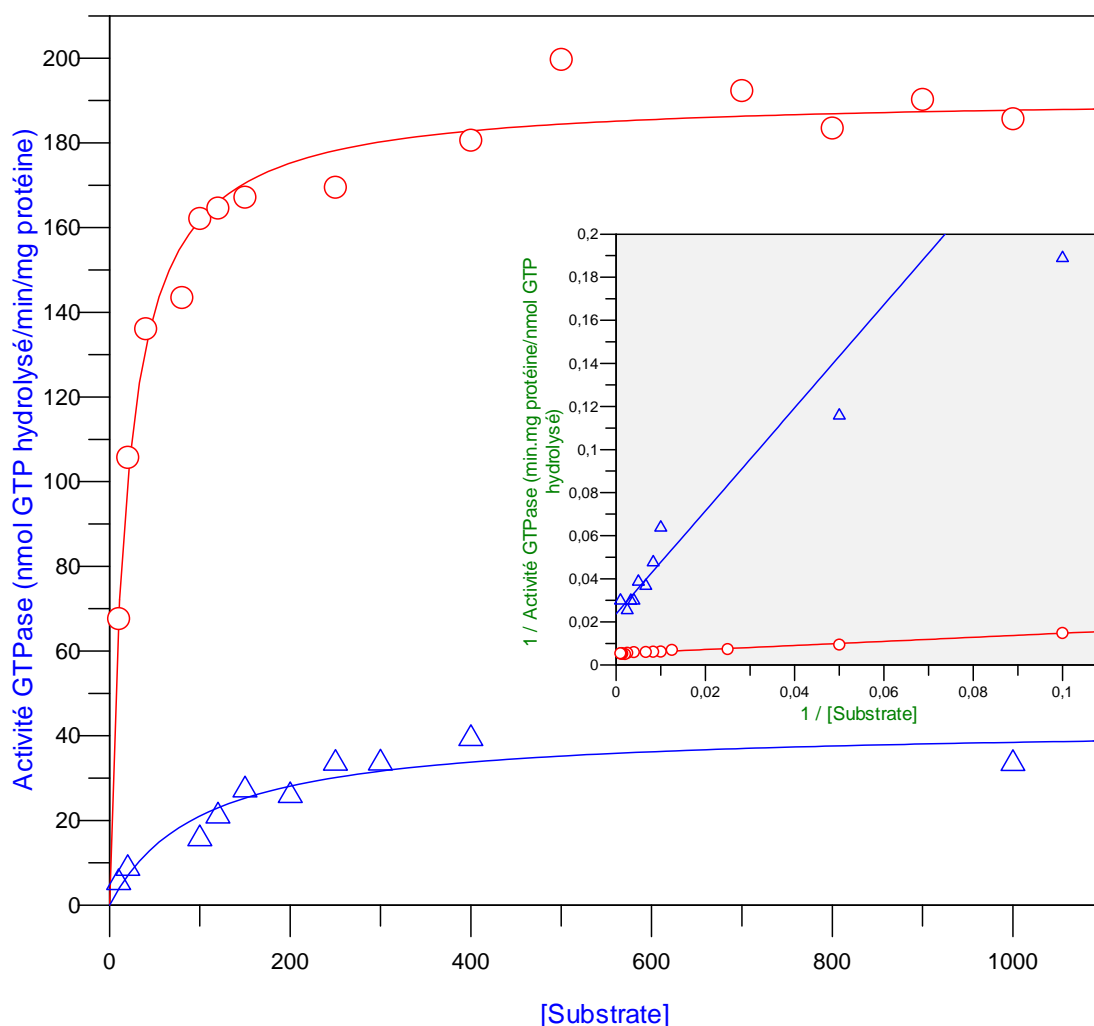
**Figure 39 : effet du potassium sur les domaines de YphC.** Les ronds noirs représentent GD1, les carrés verts représentent GD2-KH et les triangles bleus représentent GD1K16A. L'axe des ordonnées situé à gauche correspond aux mesures effectuées pour GD1 et GD1K16A, celui situé à droite correspond aux valeurs mesurées pour GD2-KH. Les mesures ont été effectuées à 1 mM GTP, à 37°C.

Les constantes cinétiques du domaine GD1 ont été mesurées en présence et en absence de sels (cf. Figure 40), un  $K_M$  de 101  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 42,3 nmol/min/mg en absence de sels et un  $K_M$  de 18,1  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 191 nmol/min/mg en présence de 300 mM de KCl sont ainsi obtenus, soit un  $k_{\text{cat}}$  de 0,87  $\text{min}^{-1}$  et 3,9  $\text{min}^{-1}$  en absence et à 300 mM de KCl respectivement. Ces valeurs sont équivalentes aux valeurs mesurées pour la protéine entière, suggérant que dans la protéine native, l'activité mesurée reflète l'activité du premier domaine et que le second domaine influence peu ou pas l'activité GTPase de la protéine. L'activité de GD2-KH étant très faible même en présence de 1 M de KCL, nous n'avons pas effectué de gamme de substrat pour ce domaine. En effet, le système que nous utilisons n'est pas adapté à

la mesure d'activité d'hydrolyse faible, et nous aurions obtenu une trop grande variabilité dans les résultats pour que cela soit pertinent.

On remarque toutefois, que le  $K_M$  de GD1 varie apparemment beaucoup en absence de sels ou à forte concentration en potassium, et l'affinité du domaine pour le GTP semble augmentée en présence de potassium. Cet effet n'était pas constaté sur la protéine entière. Ceci suggère que le domaine ne répond pas de la même façon lorsqu'il est isolé ou lorsqu'il est inclus dans la protéine. On peut alors émettre l'hypothèse que le deuxième domaine pourrait jouer un rôle non pas sur la catalyse mais sur la fixation des nucléotides.

Il convient toutefois de noter que dans le cas d'activité faible, la mesure de  $K_M$  peut être sujette à de plus grandes variations.



**Figure 40 : mesures cinétiques à différentes concentration de GTP. Calculs des constantes cinétiques de GD1, en absence de sels (triangles bleus) ou à 300 mM de KCl (rond rouge).**

Nous avons ensuite voulu savoir quelles étaient les constantes de dissociation pour les nucléotides au niveau des domaines séparés GD2-KH et GD1 afin de mieux comprendre ce que reflète les constantes mesurées pour la protéine entière.

Comme chaque domaine possède un tryptophane, nous avons suivi les variations de fluorescence de ce tryptophane après ajout de concentration croissante de nucléotides dans différentes conditions de sels, comme cela a été réalisé pour la protéine native.

Nous avons ainsi calculé les constantes de dissociations des domaines pour le GDP et le GMPPNP comme précisé dans le

Tableau 4.

|                | GDP ( $\mu\text{M}$ ) |               |                |                | GMPPNP ( $\mu\text{M}$ ) |                |               |                |
|----------------|-----------------------|---------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------|---------------|----------------|
|                | <i>NaCl</i>           |               | <i>KCl</i>     |                | <i>NaCl</i>              |                | <i>KCl</i>    |                |
|                | 50 mM                 | 300 mM        | 50 mM          | 300 mM         | 50 mM                    | 300 mM         | 50 mM         | 300 mM         |
| <b>GD1</b>     | $3,2 \pm 0,6$         | $2,5 \pm 0,3$ | $3,3 \pm 0,8$  | $4,9 \pm 0,7$  | $22,5 \pm 2,7$           | $17,8 \pm 2,4$ | $5,5 \pm 0,9$ | $34,1 \pm 4,1$ |
| <b>GD2-KH</b>  | $4,8 \pm 0,5$         | $1,6 \pm 0,2$ | $10,5 \pm 2,3$ | $5,05 \pm 0,9$ |                          | $15,3 \pm 1,9$ |               | $7,9 \pm 2,8$  |
| <b>GD1K16A</b> |                       |               |                | $24,7 \pm 3,5$ |                          |                |               |                |

**Tableau 4 : constantes de dissociation ( $K_d$ ) des domaines isolés pour les nucléotides.**

De façon générale, on mesure une affinité meilleure pour le GDP que pour le GMPPNP, ce qui est classique chez les GTPases. La concentration en sel ou la nature du sel ne semble pas affecter la fixation de nucléotides, suggérant à nouveau que le potassium n'influence pas l'affinité pour les nucléotides sur aucun des domaines (seulement une différence d'un facteur 2 entre sodium et potassium).

On ne voit pas de différence d'affinité entre les deux domaines GD1 et GD2-KH et la mutation de la lysine 16 dans GD1, qui abolit l'hydrolyse du GTP, n'empêche pas la fixation, au moins du GDP dans le domaine. L'affinité mesurée pour ce dernier peut paraître diminuée comparée au GD1 non muté mais cette différence n'est pas suffisamment marquée pour conclure que la lysine joue un rôle dans l'affinité pour le nucléotide.

Le mutant de délétion YphCAKH, n'a pas été étudié de façon aussi approfondie par manque de temps. Cependant, les résultats préliminaires montrent que ce mutant est également actif et également activé par le potassium. Une détermination de ses constantes cinétiques a permis de

définir un  $K_M$  à 45  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 61,2 nmol/min/mg soit un  $k_{\text{cat}}$  de 2,5  $\text{min}^{-1}$  à une concentration d'environ 65 mM de  $\text{K}^+$  ( $K_M$  d'environ 100  $\mu\text{M}$  et  $V_{\max}$  de 71 nmol/min/mg – soit un  $k_{\text{cat}}$  de 3,6  $\text{min}^{-1}$  pour le WT dans des conditions similaires).

Sachant que la mutation de la lysine du motif A de Walker n'empêche pas totalement la fixation du nucléotide mais empêche l'hydrolyse du GTP, nous avons voulu étudier plus en détail les mutants des lysines de la protéine entière afin de déterminer si l'activité de l'un des domaines affecte la catalyse de l'autre domaine.

### 3-3-a Les mutants de la lysine du motif A de Walker : YphCK16A et YphCK188A

La mutation de la lysine conservé du motif A de Walker est connue pour abolir l'hydrolyse du nucléotide mais n'empêche pas sa fixation (Ozvegy *et al.*, 2002).

Nous avons donc voulu voir si l'étude de ces 2 mutants nous permettait de différencier les deux domaines au sein de la protéine entière et éventuellement de voir l'influence d'un site par rapport à l'autre au niveau de l'hydrolyse. De la même façon que précédemment nous avons mesuré les activités des deux mutants et la fixation des nucléotides.

En ce qui concerne l'hydrolyse du GTP, K16A n'est pas ou très peu actif et les études de  $K_M$  et  $V_{\max}$  n'ont pas été réalisées. K188A a, quant à lui, un  $K_M$  de 157  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 36,3 nmol/min/mg en présence de 35 mM de KCl. Ces mutants sont également activés par le potassium (cf. Figure 41).

### 3-3-b Etudes des constantes de dissociation des mutants de la lysine

Comme pour la protéine native, nous avons étudié les constantes de dissociation par mesure de la variation de fluorescence. La mutation de la lysine affectant, théoriquement, l'affinité pour les nucléotides, ces études pourraient nous permettre de discriminer les deux domaines au sein de la protéine.

Les affinités de la protéine pour les nucléotides, lorsque l'une ou l'autre des lysines sont mutées, ne changent pas drastiquement. On ne constate pas d'effet marqué du potassium sur l'affinité de ces mutants pour les nucléotides (cf. Tableau 5).

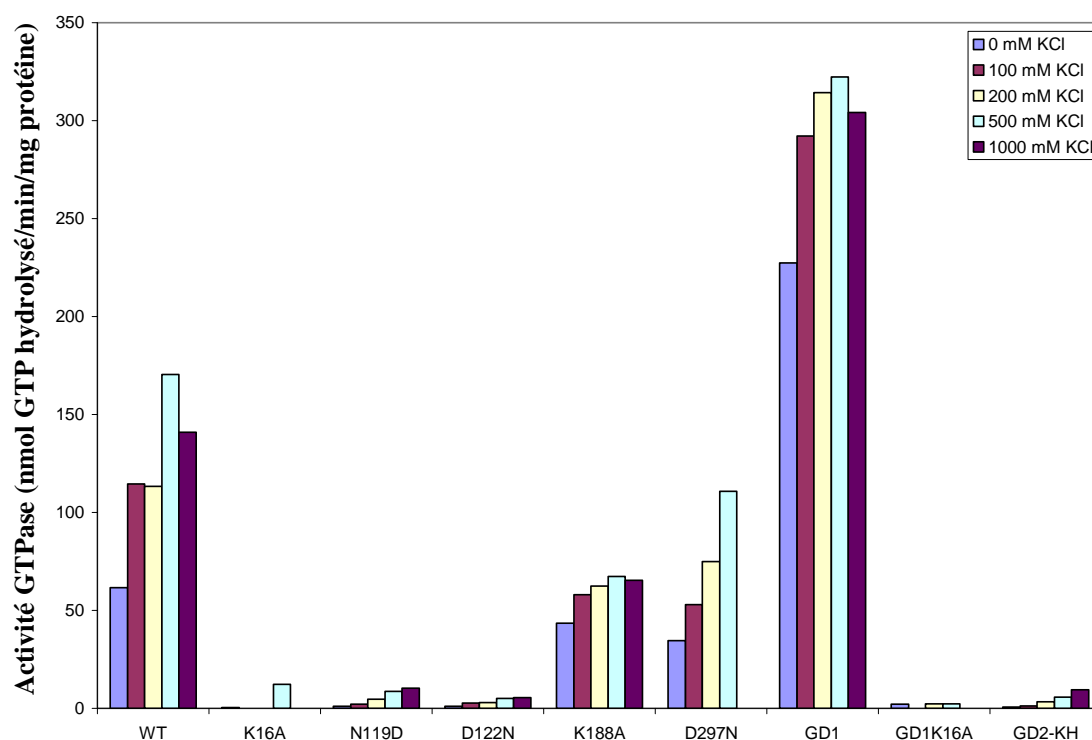
|                   | GDP          |              | GMPPNP       |                |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
|                   | NaCl         | KCl          | NaCl         | KCl            |
| <i>YphC K16A</i>  | 18,6 $\mu$ M | 25,5 $\mu$ M | 6,2 $\mu$ M  | 51,9 $\mu$ M * |
| <i>YphC K188A</i> |              | 6,3 $\mu$ M  | 27,1 $\mu$ M | 15,1 $\mu$ M   |

**Tableau 5 : Kd mesurés pour les mutants de la lysine du motif A de Walker de YphC pour les nucléotides et à 300 mM de sel. La valeur marquée par un \* ne représente qu'une seule expérience, les autres sont des moyennes.**

Ces mutants sont donc capables de fixer les nucléotides mais le domaine muté est incapable d'hydrolyser le GTP fixé dans son site. Nous avons vu que l'activité de la protéine est très affectée lorsque la lysine K16 est mutée en alanine et une activité résiduelle faible, pouvant correspondre à l'activité du GD2 au sein de la protéine, est alors mesurée. Lorsque la lysine équivalente est mutée dans le second domaine (K188), on mesure une activité GTPase qui représente environ la moitié de l'activité mesurée pour la protéine native. De plus, si l'activité de ce mutant est comparée à l'activité du GD1, on constate qu'elle est plus faible. Ceci suggère que le domaine 1, ne se comporte pas de la même façon s'il est tronqué du reste de la protéine ou s'il est étudié dans le contexte de la protéine entière. Lorsque le domaine 2 est muté mais semble toujours capable de fixer des nucléotides, l'activité du GD1 est affectée. Ceci implique que le reste de la protéine (GD2-KH) influence l'activité du domaine 1 mais peu ou pas son affinité pour les nucléotides. Il existerait donc une communication entre les deux domaines.

### 3-3-c Les autres mutants

Etant donné l'effet activateur du potassium sur la protéine native, nous avons testé cet effet sur les différents mutants générés.



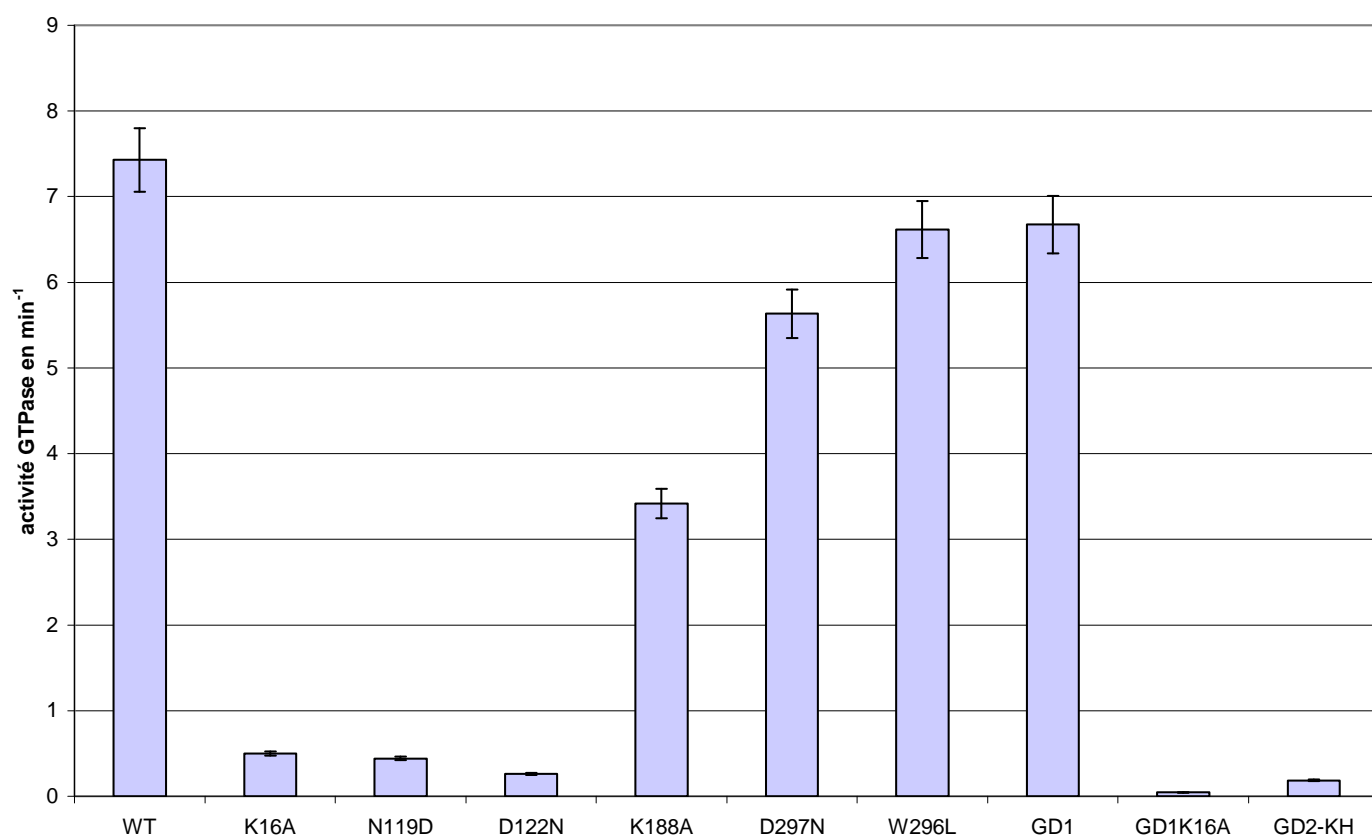
**Figure 41 : effet du potassium sur l'activité des différents mutants de YphC.** Ici, les mesures indiquées 0 mM de KCl sont en réalité effectuées en présence de 30mM de KCl qui correspondent au potassium nécessaire au fonctionnement optimal du système couplé. Pour le mutant K16A seuls les points à 0 mM et 500 mM de KCl ont été effectués.

Tous les mutants, excepté le mutant GD1K16A, sont activés par le potassium. Ceci laisse penser que toutes les protéines sont correctement repliées et que l'absence d'activité ou la faible activité mesurée en absence ou à faible concentration en potassium n'est pas liée à un mauvais repliement de la protéine mais bien à la mutation introduite (cf. Figure 41). De plus, aucune des mutations générées n'affectent la fixation du potassium dans la protéine de façon significative. Dans le cas du mutant K16A, on observe une activation par le potassium à 500 mM de KCl équivalente à celle observée sur GD2KH seul. Ce résultat suggère que le deuxième domaine est actif et activable par le potassium dans la protéine entière.



Pour comparer tous les mutants entre eux, nous nous sommes placés à une concentration quasi-saturante de 500 mM de KCl afin de s'affranchir de tout effet lié au potassium (cf. Figure 42).

Dans ces conditions, les mutants générés sur le premier domaine de la protéine affectent drastiquement l'activité de la protéine. En revanche, ceux touchant le second domaine GTPase ont un effet moins drastique, le mutant W297L étant le moins touché et montrant un  $k_{cat}$  équivalent à celui mesuré pour le domaine GD1 seul. Le mutant de la lysine K188A montre toutefois une activité bien affectée, suggérant que (i) l'absence d'hydrolyse du GTP au niveau du GD2 affecte la catalyse au niveau du GD1 ou (ii) que la communication entre les deux domaines est altérée chez ce mutant.



**Figure 42 : comparaison des activités GTPases de la protéine sauvage et de ses mutants à 1 mM en GTP et en présence de 500 mM de KCl.**

Les  $K_M$  et  $V_{max}$  mesurés pour ces mutants ne sont pas comparables les uns par rapport aux autres car ils n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions de sels et ces expériences

nécessitent d'être répétées. Les valeurs préliminaires mesurées sont un  $K_m$  de 150  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 63 nmol/min/mg pour YphCD297N en présence de 44 mM de KCl et un  $K_M$  de 346  $\mu\text{M}$  et un  $V_{\max}$  de 71 nmol/min/mg pour le mutant YphCW297L à 300 mM de potassium. Cependant ces résultats sont à vérifier. En effet, dans le cas du mutant tryptophane, des activités spécifiques plus importantes ont été mesurées notamment lors des tests d'activités enzymatiques effectués pour vérifier la fonctionnalité des différentes préparations de la protéine.

Les mutants W297A et D122N-D297N ne peuvent pas être introduits dans cette comparaison car aucune activité n'a été mesurée dans les mêmes conditions pour ces mutants.

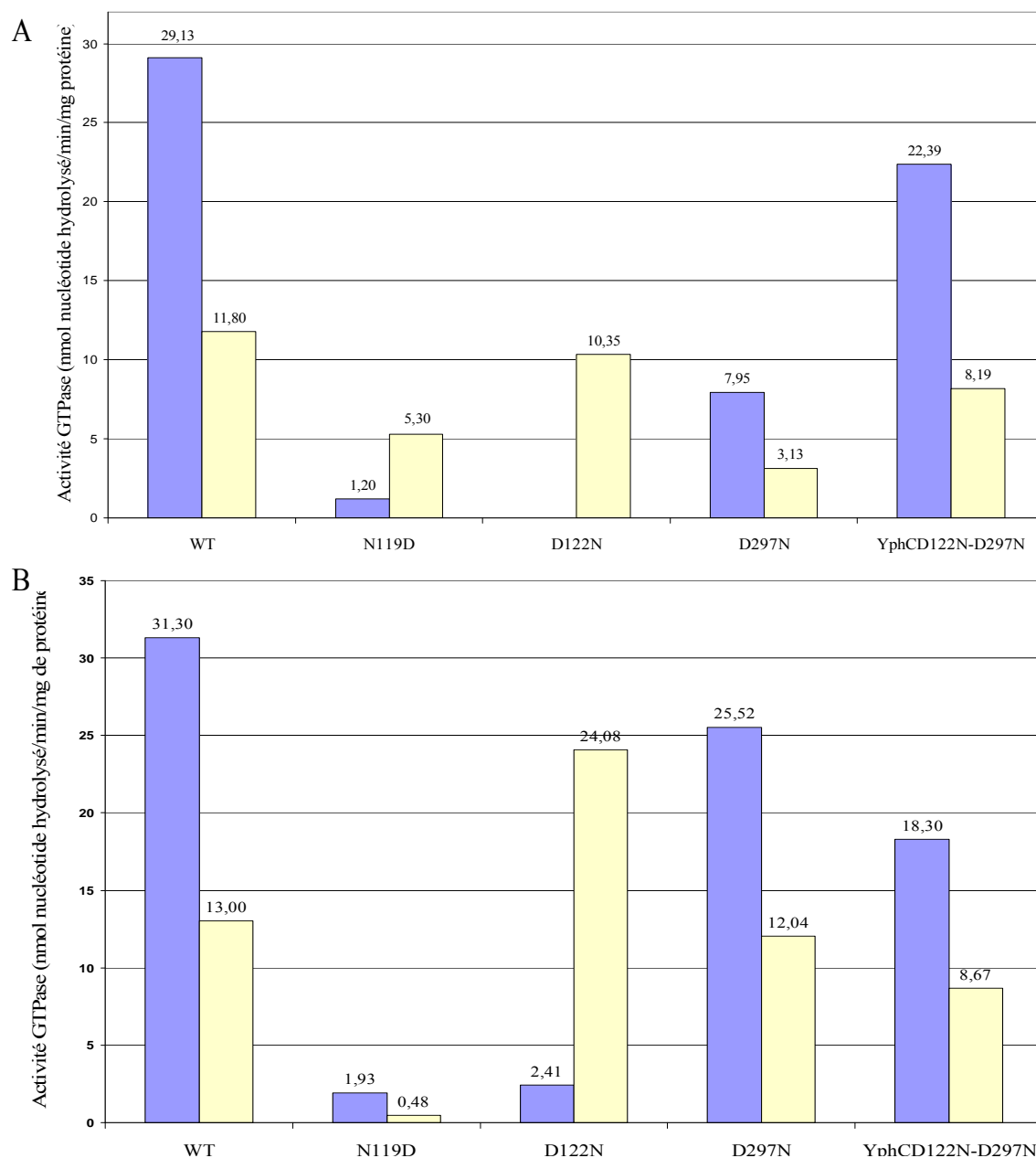
### *Spécificité pour les nucléotides*

Nous avons généré plusieurs mutants touchant le motif impliqué dans la spécificité des GTPases. En effet il a été montré précédemment sur différentes GTPase telle que Ras (Zhong *et al.*, 1995), EF-Tu (Hwang et Miller, 1987) ou encore FtsY (Powers et Walter, 1995) que la mutation de l'aspartate conservé du motif 4 des GTPases induisait un changement dans la spécificité de la protéine pour le nucléotide. Nous avons voulu tester l'activité catalytique de ces mutants pour le GTP et pour le XTP afin de voir si la mutation générée affecte l'hydrolyse du GTP et au contraire confère une activité hydrolytique pour le XTP.

Nous avons donc effectué des tests d'activité en présence de système couplé à 100, 150 ou 200  $\mu\text{M}$  de nucléotide, les solutions commerciales de XTP ne nous permettant pas d'effectuer des tests à des concentrations supérieures.

Dans les différents tests réalisés à différentes concentrations de nucléotides, les résultats obtenus sont similaires, bien que les valeurs d'activité varient. (cf. Figure 43).

Des tests d'hydrolyse de l'ATP (à 100  $\mu\text{M}$  et à 1 mM) ont également été réalisés, et aucune activité ATPase significative n'a été observée pour aucun des mutants. Les protéines présentent donc une spécificité marquée pour le GTP.



**Figure 43 : hydrolyse des nucléotides par les différents mutants des motifs G4. A-expérience à 100  $\mu$ M de nucléotide. B-expérience à 200  $\mu$ M de nucléotide. Le GTP est en bleu et l'XTP en jaune. Les valeurs des activités mesurées sont indiquées**

Toutefois, la protéine native est capable d'hydrolyser le XTP. Le mutant N119D hydrolyse mieux le XTP que le GTP à 100  $\mu$ M mais apparemment pas à 200  $\mu$ M. Le mutant D122N hydrolyse mieux le XTP que le GTP à 100 et à 200  $\mu$ M. Le mutant D297N hydrolyse mieux le GTP que l'XTP dans les deux conditions de concentration en nucléotide, ce qui est en

accord avec l'activité GTPase de YphC et de ses mutants. Le double mutant, quant à lui hydrolyse mieux le GTP que le XTP, dans tous les cas.

Les résultats obtenus sur les simples mutants sont assez cohérents et méritent d'être confirmés. Le résultat obtenu pour le double mutant, en revanche, est contradictoire avec les autres résultats et difficile à expliquer. La présence de la double mutation au niveau du plasmide a bien été confirmée.

Il faut tout de même noter que nous ne sommes pas en condition saturante de nucléotide. Des études de la fixation des différents nucléotides par fluorescence sont à envisager et une caractérisation approfondie du double mutant est envisagée pour essayer de comprendre ce résultat.

#### **4-Etude par thermal shift assay**

Pour vérifier la stabilité de la protéine, l'effet du potassium et des nucléotides, nous avons étudié la dénaturation thermique d'YphC et de certains des mutants en suivant l'incorporation d'une sonde fluorescente au cours de la dénaturation par la chaleur.

La fluorescence de la sonde SYPRO orange est mesurée par l'appareil et restituée en temps réel. A la fin de l'expérience, nous obtenons des courbes de fluorescence relative en fonction de la température qui nous permettent de calculer la température de demi-dénaturation. Cette mesure est simplifiée par la représentation de la dérivée première de ces courbes comme montré en Figure 44.

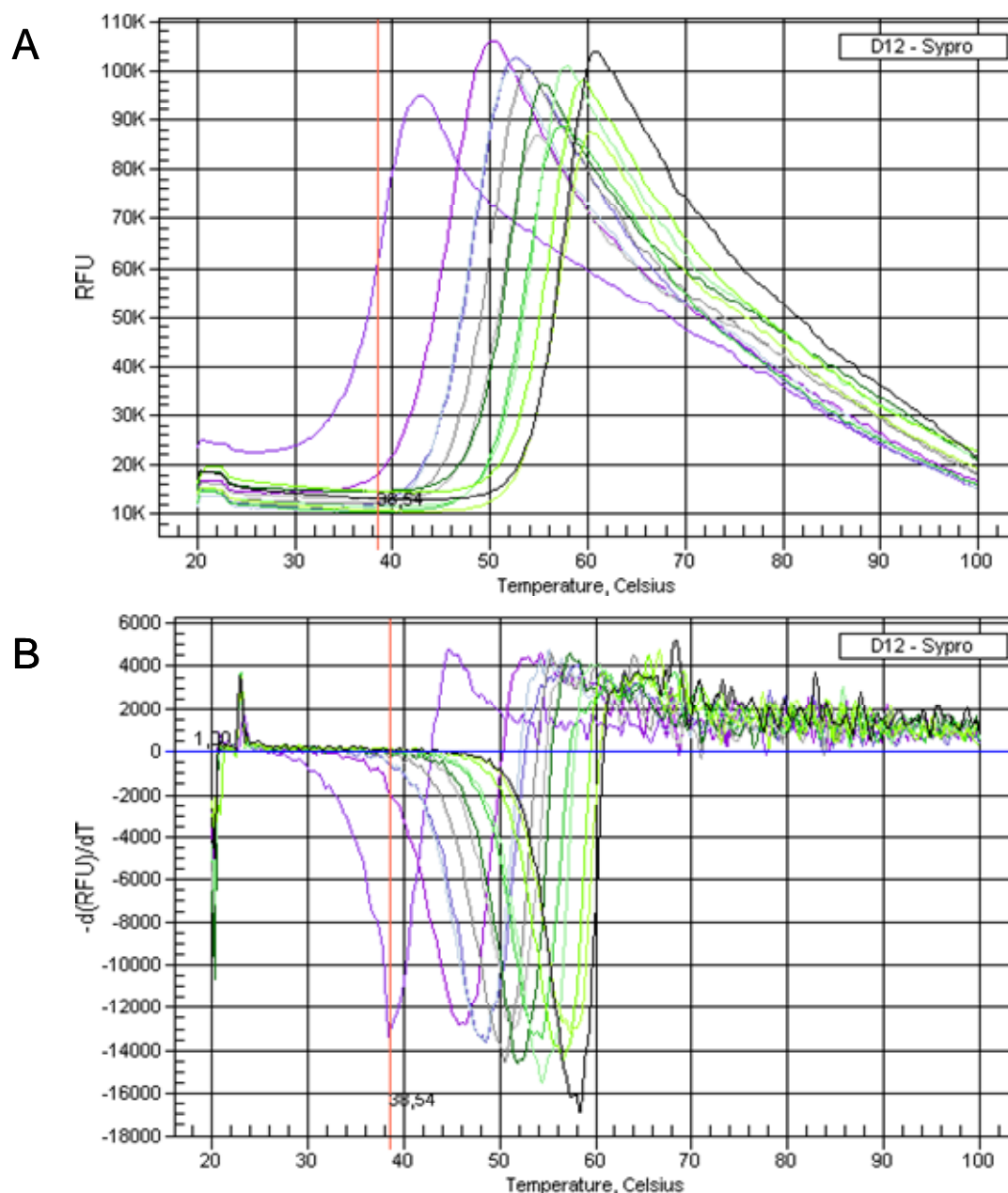
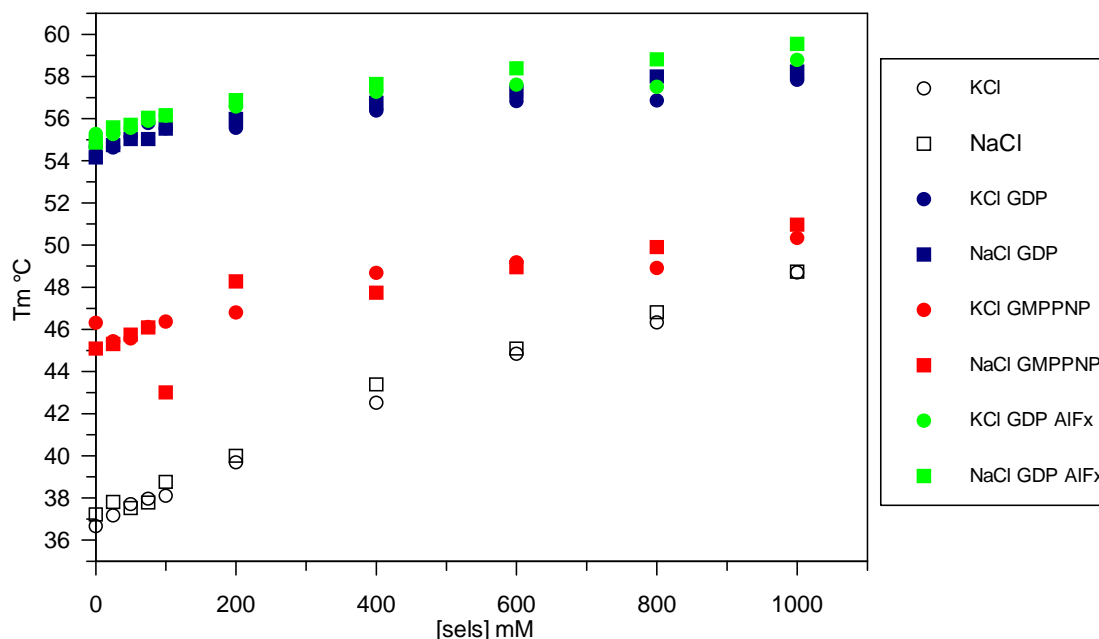


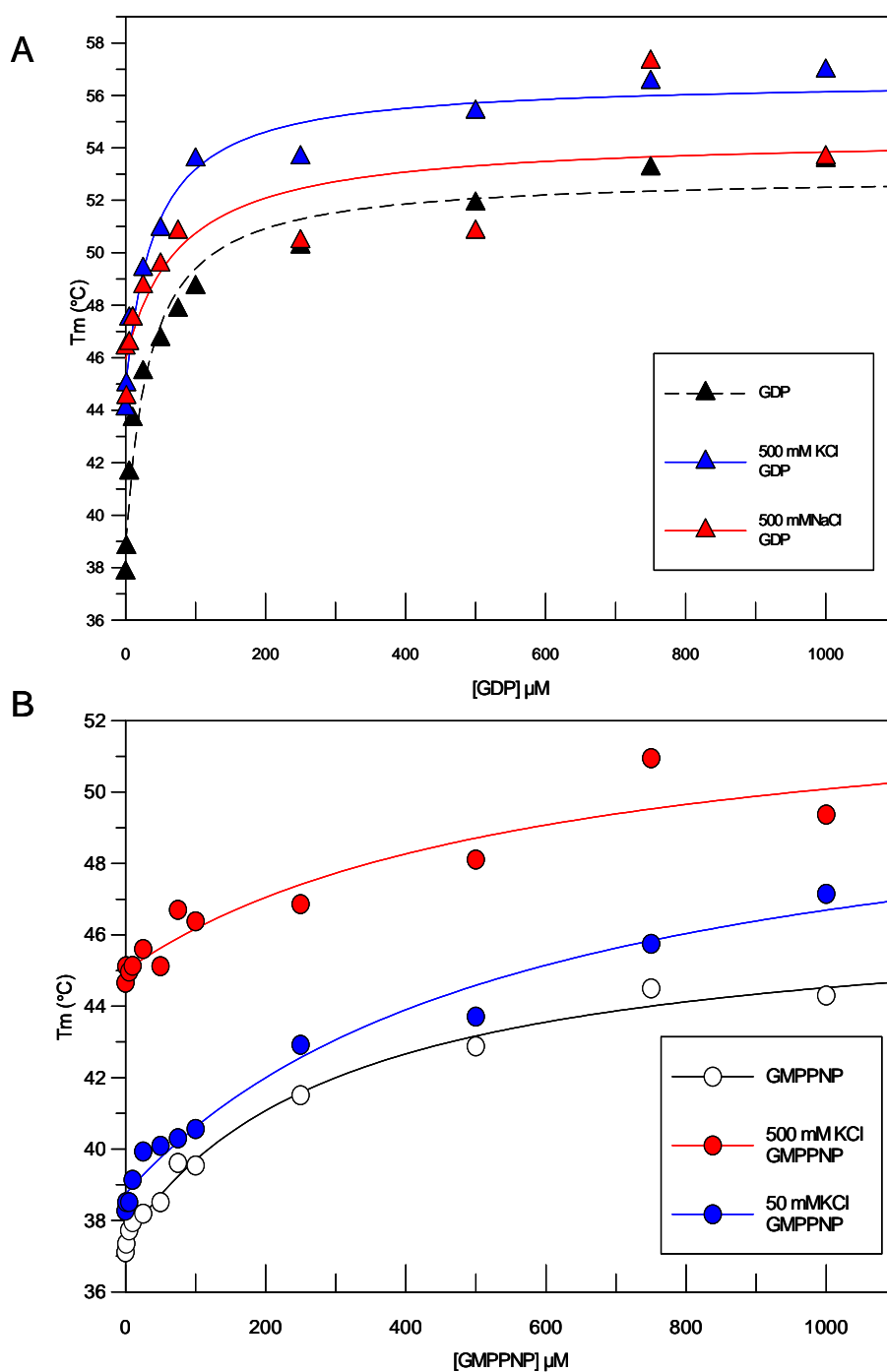
Figure 44 : données expérimentales de dénaturation thermique. Dénaturation de YphC en présence de 1 mM de GDP et à différentes concentrations en KCl. A : mesure directe de la fluorescence du SYPRO orange qui s'incorpore dans la protéine au cours de l'expérience. Représentation des unités relatives de fluorescence (RFU) en fonction de la température en °C. B : représentation de la dérivée première des courbes de dénaturation de la protéine. Un exemple de mesure de température de demi-dénaturation est représenté par la ligne rouge et le  $T_m$  mesuré est affiché. Le  $T_m$  est défini à la moitié de la hauteur du pic de fluorescence en représentation directe (A) ou au minimum de la courbe en représentation de dérivée première (B).

Ainsi nous avons pu mesurer les températures de demi-dénaturation ( $T_m$ ) dans différentes conditions de sel (cf. Figure 45) ou de nucléotides (cf. Figure 46).



**Figure 45 : variation du  $T_m$  de YphC de type sauvage en fonction de la concentration en sel. Les expériences sont réalisées en présence de 1 mM de nucléotide. Le GDP- $AlF_x$  est formé dans le puits par adjonction de 1 mM de GDP 1 mM d' $AlCl_3$  et 10 mM de NaF.**

On voit que les résultats sont identiques en NaCl et KCl. L'augmentation de la concentration en sel entraîne une augmentation du  $T_m$ . La protéine résiste donc mieux à la dénaturation thermique en présence de sels qu'en absence de sels, passant d'un  $T_m$  à 37°C en absence de sels à un  $T_m$  de 48°C à 1 M de sels. En présence de nucléotide, l'effet de la concentration en sels est moins marqué et l'on passe d'un  $T_m$  à 46°C pour le GMPPNP ou 55°C pour le GDP ou le GDP  $AlF_x$  en absence de sels à un  $T_m$  de 50°C ou 60°C pour le GMPPNP ou le GDP en présence de 1 M de sels, respectivement. Ainsi, en absence de nucléotide, on enregistre une variation du  $T_m$  d'environ 10°C alors que cette variation n'est que de 4°C en présence de nucléotides. On note également que le GDP stabilise plus la protéine que le GMPPNP.



**Figure 46 : variation du  $T_m$  de YphC native en présence de différents nucléotides et à une concentration fixe de sels. A : effet du GDP sur le  $T_m$ . B : effet du GMPPNP sur le  $T_m$ .**

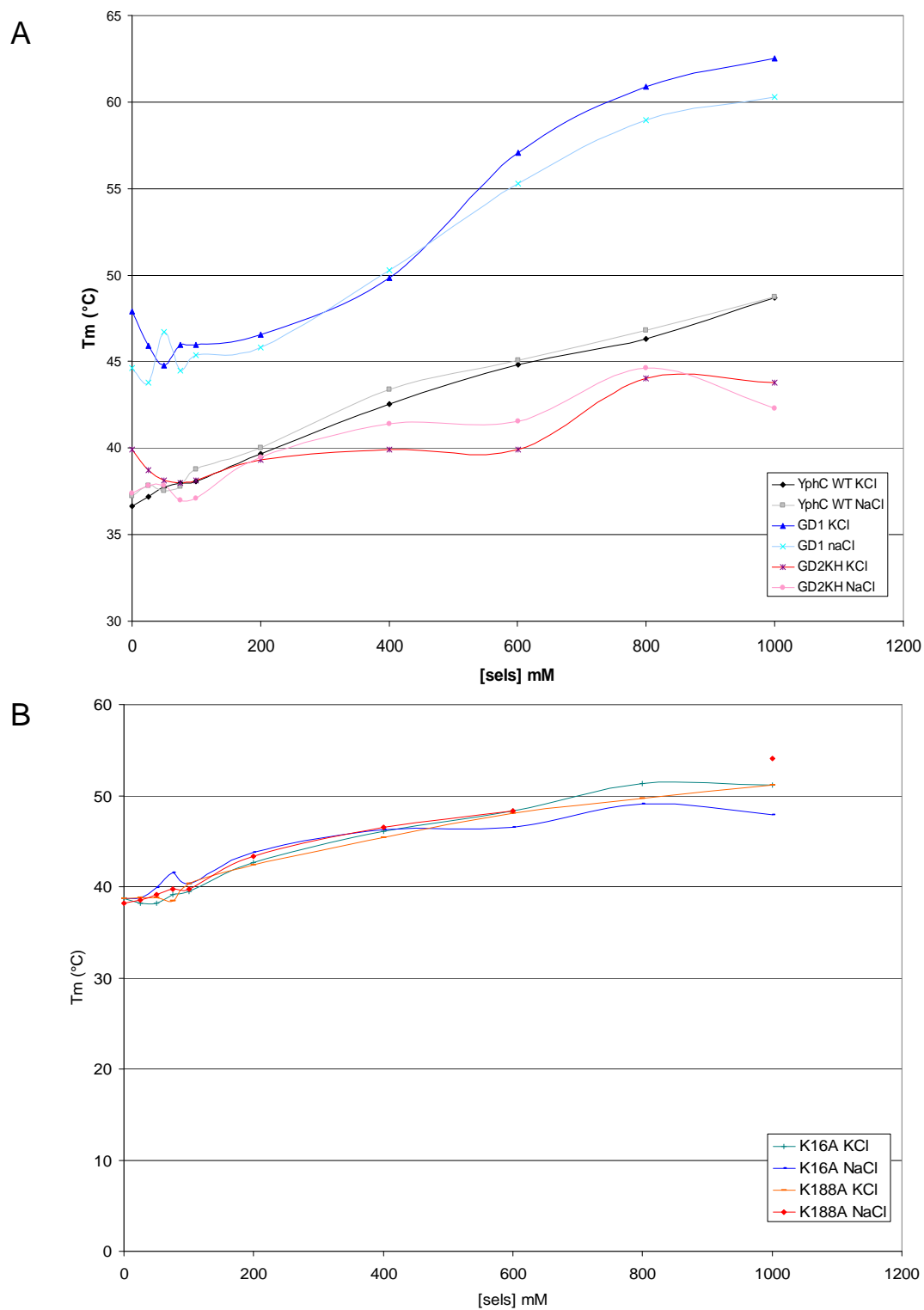
Lorsqu'on fait varier la concentration en nucléotide à une concentration fixe de sels, on mesure à peu près les mêmes variations que précédemment. On constate toutefois que l'on obtient un plateau plus rapidement et plus nettement en GDP qu'en GMPPNP, suggérant encore une fois que le GDP stabilise plus la protéine (cf. Figure 46).

Des études de dénaturation thermique à différentes concentrations de sels ont été menées sur les mutants YphCK16A et YphCK188A ainsi que sur les mutants de délétion GD1 et GD2-KH (Cf .Figure 47).

Ces résultats confirment que les mutants de la lysine catalytique sont correctement repliés et se comportent comme la protéine native. Le domaine GD1 semble plus stable que la protéine entière alors que le mutant de délétion GD2-KH semble un peu moins stable à forte concentration en sels. Dans tous les cas, on ne distingue pas de différence entre le potassium et le sodium.

Les études en présence de nucléotides devront être faites pour confirmer l'effet stabilisateur des nucléotides sur ces mutants. De même le mutant GD1K16A devra être étudié par cette méthode.



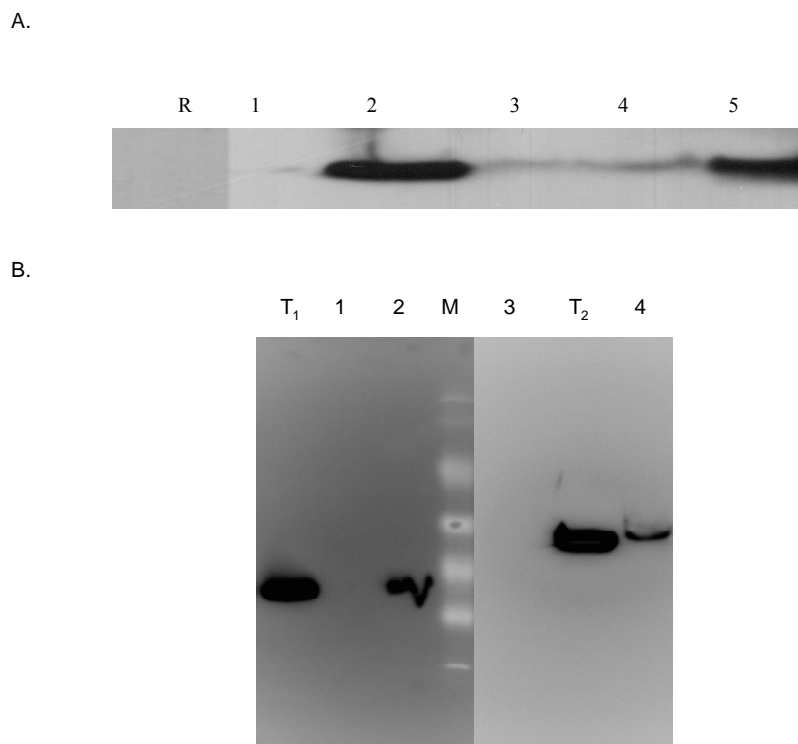


## **5-Etudes fonctionnelles**

YphC était, au début de ce travail, une protéine de fonction inconnue. La résolution de sa structure 3D, établissant la présence d'un domaine de type KH en C-terminal, laissait supposer qu'elle pouvait être capable de se lier à des acides nucléiques. Des études de profils ribosomaux, réalisées par notre collaborateur le Dr Robert Britton (Michigan State university, East Lansing), ont montré qu'une souche mutante de *Bacillus subtilis*, dans laquelle le gène codant pour YphC a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG, montrait une diminution importante de la quantité de ribosome 70S et une migration anormale de la sous-unité 50S des ribosomes en gradient de saccharose lorsque le gène n'était plus induit. Ce résultat suggérait qu'YphC pouvait jouer un rôle dans la biogenèse ou la maturation des ribosomes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'interaction entre la protéine et les ribosomes totaux extraits de la souche sauvage de *Bacillus subtilis*.

L'expérience confirme que YphC est capable d'interagir avec une fraction totale de ribosomes. Cette interaction a lieu en absence de nucléotide ou en présence de GMPPNP mais semble être inhibée en présence de GDP ou de GTP (cf. Figure 48A).

Comme il y a du magnésium dans le milieu réactionnel (obligatoire pour maintenir l'intégrité des ribosomes), l'inhibition de l'interaction par le GTP est sans doute due à l'hydrolyse de celui par YphC. YphC est donc capable d'interagir avec les ribosomes de façon nucléotide dépendante. Une expérience similaire a été réalisée avec les domaines séparés, GD1 et GD2-KH (cf. Figure 48B).



**Figure 48 : interaction de YphC avec les ribosomes. Détection de YphC par Western blot, à l'aide d'une sonde anti-étiquette histidine (Perbio), après ultracentrifugation sur coussin de saccharose. A : interaction de la protéine WT, R : ribosomes totaux, 1 : YphC seul ; 2 : YphC +ribosomes totaux ; 3 : YphC + ribosomes totaux + 2 mM GTP ; 4 : YphC+ ribosomes totaux + 2 mM GDP ; 5 : YphC +ribosomes totaux + 2 mM GMPPNP. (Schaefer *et al.*, 2006). B : interaction des mutants de délétion avec les ribosomes totaux. 1 : 200 pmol GD1 ; 2 : 200 pmol GD1+ 200 pmol ribosomes totaux ; 3 : 200 pmol GD2-KH ; 4 : 200 pmol GD2-KH+ 200 pmol ribosomes totaux. T1 et T2 sont les témoins positifs de détection pour GD1 et GD2-KH respectivement. Le Western Blot présenté dans le panneau A à été révélé sur film photographique, celui présenté dans le panneau B a été révélé à l'aide d'un appareil Kodak image station 4000 MM.**

Ces expériences montrent que GD1 seul ou GD2-KH sont capables d'interagir avec les ribosomes de *Bacillus subtilis*. Ainsi les deux domaines semblent intervenir dans l'interaction avec les ribosomes. Ces expériences étant également réalisées avec des fractions brutes de ribosomes, nous ne sommes pas en mesure de dire si les deux domaines interagissent avec la même particule ou des particules différentes (70S, 30S ou 50S). Il faudrait donc caractériser plus en détail ces interactions afin de déterminer si les deux sous unités interviennent de façon différente dans l'interaction et/ou la biogénèse des ribosomes.

# DISCUSSION



## **1-Activités enzymatiques et affinités**

La protéine montre une bonne activité d'hydrolyse du GTP élevée particulièrement en présence de potassium. En absence d'ion potassium, l'activité mesurée est faible (7 nmol de GTP hydrolysé/min/mg ou  $0,35 \text{ min}^{-1}$ ). Bien qu'elle ait pu être définie comme une GTPase lente dans la littérature (Brown 2005), l'activité mesurée reste supérieure à l'activité de beaucoup de GTPases telles que Ras ( $5,3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) (Gibbs *et al.*, 1984) ou encore Era ( $9,8 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) (Chen *et al.*, 1990a). On peut donc considérer que YphC est une GTPase à forte activité bien que des GTPases encore plus active ont été décrites : MnmE-  $9,3 \text{ min}^{-1}$  chez *T. maritima* et  $26 \text{ min}^{-1}$  chez *E. coli*. (Yamanaka *et al.*, 2000).

Les activités spécifiques que nous mesurons sont assez supérieures ( $k_{\text{cat}}$  mesuré à  $7,6 \text{ min}^{-1}$  à 300 ou 500 mM de KCl) à celle décrites pour Der de *T. maritima*, pour lequel un  $k_{\text{cat}}$  de  $0,87 \text{ min}^{-1}$  a été mesuré en présence de 400 mM de KCl (Hwang et Inouye, 2001) ou Eng A de *E. coli* pour lequel un  $k_{\text{cat}}$  de  $1,16 \text{ min}^{-1}$  a été mesuré également en présence de 400 mM, de KCl (Bharat *et al.*, 2006). Cette différence peut être attribuée aux techniques utilisées. Nous utilisons un système couplé qui régénère en permanence le GDP en GTP, permettant de rester à saturation en substrat tout au long de la réaction et empêchant la compétition entre le GDP et le GTP de se produire. Dans la littérature, les techniques utilisées mesurent le phosphate radioactif relargué et le GDP produit s'accumule dans le milieu réactionnel. Les GTPases ayant une meilleure affinité pour le GDP que pour le GTP, on peut supposer que la présence du produit de la réaction tende à ralentir ou inhiber l'hydrolyse du GTP par compétition.

En revanche, l'affinité pour les nucléotides est faible. C'est assez surprenant pour une GTPase car les affinités mesurées pour les GTPases de la famille de Ras sont de l'ordre du nM (Sigal *et al.*, 1986) mais cette faible affinité a également été décrite pour MnmE (Scrima et Wittinghofer, 2006; Yamanaka *et al.*, 2000) ou encore Era (Sullivan *et al.*, 2000). Nous mesurons toutefois une meilleure affinité pour le GDP que pour le GMPPNP en absence de sel ou en présence de NaCl, mais les valeurs mesurées ne sont pas drastiquement différentes et sont même équivalentes en présence de potassium.

La présence de deux domaines GTPase dans la protéine rend l'interprétation de ces résultats assez difficile. En effet, aucune des expériences menées n'a permis de distinguer les deux sites, laissant supposer qu'ils sont équivalents et se comportent de la même façon. L'étude des mutants a montré que ce n'était pas le cas. Les mutations touchant le 1<sup>er</sup> domaine sont

délétères pour l'activité hydrolytique alors que celles touchant le 2<sup>e</sup> domaine affectent moins cette activité. L'étude des mutants de délétion a montré que GD1 est très actif alors que GD2-KH l'est peu ou pas. Ces résultats suggèrent que l'activité d'hydrolyse du GTP de YphC est majoritairement portée par le GD1 et que GD2 jouerait plus un rôle de régulateur de cette activité.

Cette différence de comportement des deux domaines peut être expliquée par la composition des régions switch des deux sites. En effet, si l'on compare les acides aminés qui suivent le motif B de Walker dans le switch II (impliqué dans l'hydrolyse du GTP) on constate que les acides aminés trouvés dans le domaine 1 sont plutôt acides alors que ceux trouvés dans le domaine 2 sont plutôt basiques. (cf. Figure 49). Il est vraisemblable que l'un des résidus acide dans GD1 soit directement impliqué dans l'hydrolyse acide-base du GTP, e.g l'aspartate 61 dans la figure 49, comme cela a été montré pour le glutamate 282 de MnmE (Scrima et Wittinghofer, 2006). A l'inverse, l'absence de résidu acide dans cette région de GD2 rendrait ce domaine beaucoup moins efficace pour l'hydrolyse du GTP.

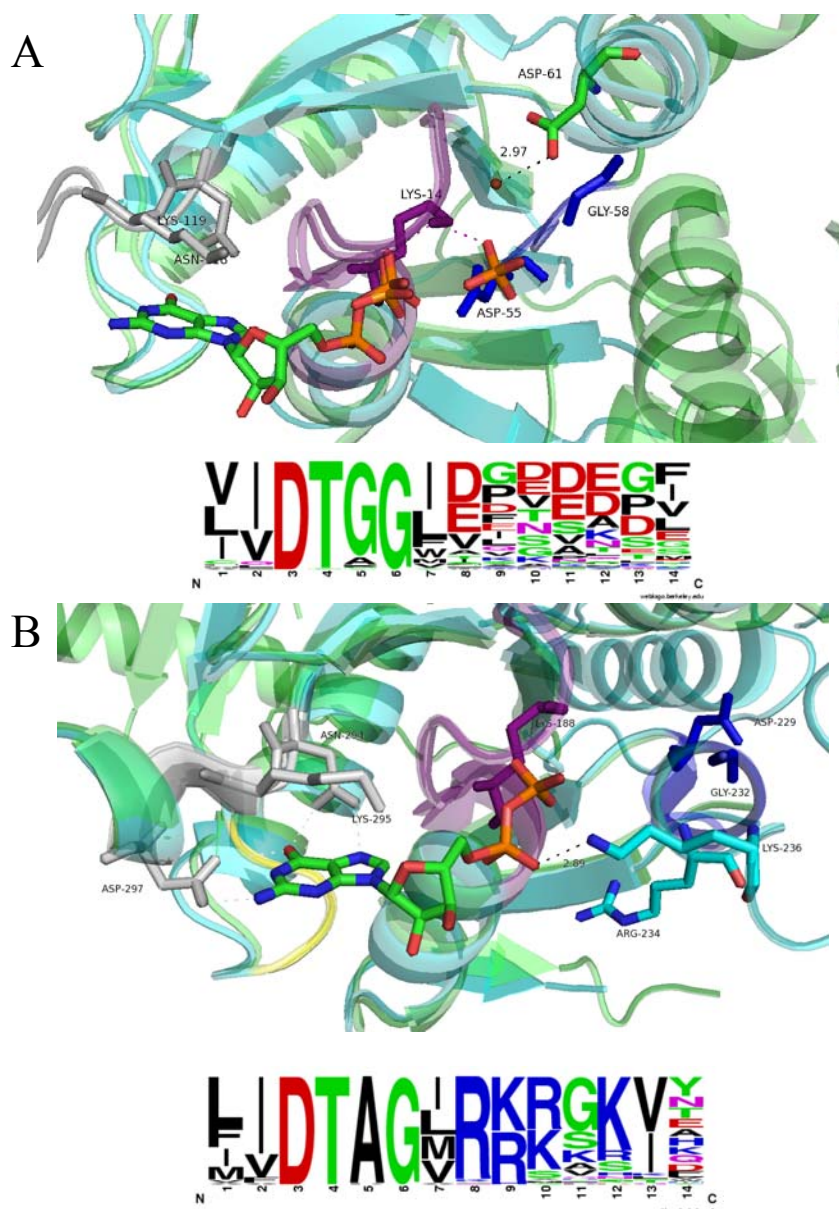


Figure 49 : représentation des deux sites catalytiques de domaines de EngA avec la structure de EngA de *T. maritima* en vert (fichier pdb 1MKY) et celle de EngA de *B. subtilis* en cyan (fichier pdb 2HJG). La chaîne principale est représentée en ruban, le GDP et les acides aminés conservés des motifs sont représentés en bâtonnets. Le motif G1 est représenté en violet, le motif G3 est représenté en bleu foncé, le motif G4 est représenté en gris et le motif G5 en jaune. Les molécules d'eau sont représentées par une boule marron. Et les interactions sont schématisées par une ligne pointillée noire. La séquence consensus de la région switch II extraite à partir de 200 séquences orthologues de EngA analysée avec Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) est représentée. A : visualisation du site catalytique du domaine 1. L'aspartate 61 dans la séquence de *T. maritima* est représentée en bâtonnet. B : visualisation du site catalytique du domaine 2. L'arginine 234 conservée et la lysine 236 dans la séquence issue de *B. subtilis* sont représentées en bâtonnets.



Les deux domaines ne seraient donc pas équivalents en termes d'activité. Si l'un des domaines régule l'autre, il est possible que les affinités des deux domaines pour les nucléotides ne soient pas identiques. Cependant, les études menées par fluorescence n'indiquent pas que les domaines soient différents sur ce point et les domaines séparés montrent des affinités faibles pour les nucléotides. Ceci va à l'encontre des valeurs publiées pour EngA de *Salmonella* ou l'étude par microcalorimétrie a montré que la protéine possède deux classes de site, l'un de forte affinité et l'autre de faible affinité (Lamb *et al.*, 2007). Ces affinités ont, de plus, été mesurées en absence de magnésium qui est connu pour améliorer l'affinité des NTPases pour les nucléotides (Hisabori *et al.*, 1986; Self et Hall, 1995). Des essais préliminaires de mesure de  $K_d$ , en présence de magnésium, par microcalorimétrie ont été réalisés sur YphC. Nous n'avons, malgré tout, pas été capables, pour l'instant, de discriminer les deux sites mais les conditions utilisées doivent encore être optimisées.

L'étude des mutants de la lysine du motif A de Walker n'a pas non plus permis de distinguer les deux sites. Ces mutations ont été décrites comme affectant l'hydrolyse du nucléotide et elles diminuent également l'affinité pour les nucléotides. Dans notre cas, la mutation de la lysine sur le domaine 1 semble diminuer légèrement l'affinité du domaine pour le GDP mais la mutation d'un seul des deux sites sur la protéine entière n'est pas suffisante pour mesurer un  $K_d$  très différent.

Ceci renforce l'hypothèse que les valeurs mesurées reflètent certainement une moyenne pour les deux sites, qu'ils exercent une influence l'un par rapport à l'autre et que la mutation de la seule lysine du motif A de Walker n'est pas suffisante pour diminuer drastiquement l'affinité pour les nucléotides ou même empêcher la fixation de ceux-ci. De plus, nous avons vu la mutation de la lysine conservée de la P-loop au niveau du premier domaine est activable par le potassium dans les mêmes proportions que le domaine GD2-KH isolé. Suggérant que dans ce mutant, l'activité résiduelle mesurée correspond à celle du GD2-KH au sein de la protéine. La mutation identique au niveau du domaine 2, montre une activité altérée par rapport à celle de la protéine native ou du domaine GD1 isolé. Ceci laisse supposer que l'absence d'hydrolyse du GTP ou de fixation du nucléotide sur ce domaine influence de façon significative l'hydrolyse du GTP au niveau du premier domaine. Il existerait donc une communication entre les deux domaines qui ferait intervenir l'hydrolyse ou la fixation du GTP au niveau du GD2. L'hydrolyse du GTP ou encore la fixation des nucléotides dans la liste catalytique d'une GTPase entraîne des changements conformationnels. Il est donc fortement probable que ce soit ces changements conformationnels qui interviennent dans la

communication entre les deux domaines et donc dans la régulation du domaine 1 par le domaine 2.

Enfin, les mutations des motifs 4 pourraient avoir un effet plus délétère sur la fixation des nucléotides. Notamment, les mutations des aspartates des motifs 4 sont décrites pour altérer la spécificité du site et transformer une préférence pour la base guanine vers la base xanthine (Shan et Walter, 2003). Les expériences effectuées durant cette thèse n'ont pas permis d'éclaircir ce point et des expériences de fluorescence devront être effectuées pour analyser plus en détail l'effet des mutations.

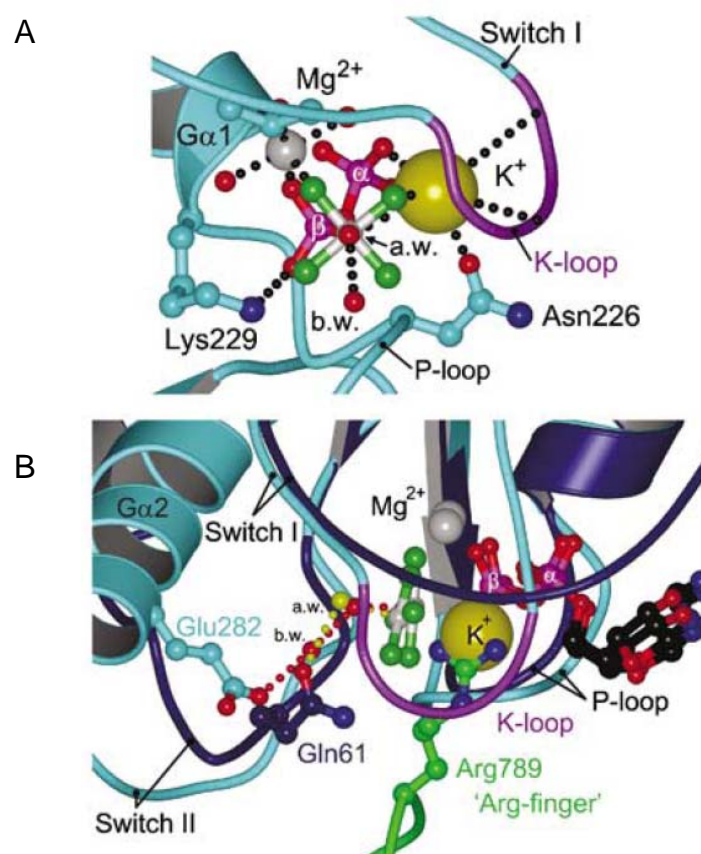
## **2-Effet du potassium**

Der de *Thermotoga* a été décrite comme une protéine activée par le potassium. Dans le travail présenté ici, nous avons voulu étudier cet effet d'activation plus en détail. Les résultats montrent que YphC est activée très fortement par le potassium et on enregistre une activité 20 à 30 fois supérieure à 500 mM KCl (150 nmol/min/mg à 500 mM KCl contre 5,7 nmol/min/mg à 500 mM NaCl ou 7 nmol/min/mg en absence de sels.) L'activité en présence de potassium est donc très importante. Compte tenu des concentrations intracellulaires de potassium (entre 150 et 250 mM chez *E. coli* voire plus si la pression osmotique du milieu augmente et 400 mM chez les Gram + comme *B. subtilis* - (Teixeira de Mattos et Neijssel, 1997), on peut supposer que la protéine sera toujours en présence de potassium et que son activité « naturelle » dans la cellule sera toujours élevée. YphC peut donc être considérée comme une GTPase à forte activité d'hydrolyse.

Les résultats obtenus dans les différentes conditions montrent une augmentation de l'hydrolyse du GTP mais peu de variation sur l'affinité pour les nucléotides. Le potassium serait donc un activateur non essentiel de la protéine et agirait comme une « GAP » chimique en amenant une charge positive supplémentaire dans le site catalytique.

Cet effet d'activation de l'activité GTPase par le potassium a été montrée pour d'autres GTPases. Ainsi MnmE, une GTPase possédant plusieurs domaines et impliquée dans la modification de l'uridine en position Wobble des ARNt, est activée par le potassium (Yamanaka *et al.*, 2000). Cette activation ne changerait pas l'affinité pour les nucléotides comme nous l'observons pour YphC. De plus, la combinaison du potassium et du GDP-AlFx (nucléotide mimant l'état de transition) entraîne une dimérisation du domaine G de MnmE. La

résolution de la structure 3D en présence de potassium ou rubidium et de GDP AlF<sub>x</sub> a montré que le potassium se fixe au niveau du switch I de MnmE juste avant le motif G2 au niveau d'une boucle potassium (K-loop). Le potassium est hexacoordonné et forme des liaisons avec le phosphate  $\beta$  du GDP et l'ion fluor.



**Figure 50 : représentations du site catalytique de MnmE. A : site catalytique de MnmE vu depuis la molécule d'eau qui dirige l'attaque nucléophile vers l'AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> mimant le phosphate  $\gamma$ . La K-loop avec le phosphate, l'AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> et l'asparagine 226 coordonnent l'ion potassium et le protège du solvant environnant. Les 3 charges + provenant du  $\text{K}^+$ , du  $\text{Mg}^{2+}$  et de la lysine 229 de la P-loop forment un triangle autour de l'oxygène pontant les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$ . B : Superposition des structures de MnmE lié au GDP AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> (en cyan) et de Ras-RasGAP (Ras en bleu foncé et RasGAP en vert). Les molécules d'eau sont représentées par des boules rouges (b.w.) et jaunes (a.w.) provenant respectivement des structures de MnmE et Ras. On note la superposition de l'ion  $\text{K}^+$  avec le groupement guanidinium de l'arginine 789 de Ras GAP ainsi que la juxtaposition de la molécule d'eau b.w. et de la glutamine 61 de Ras. D'après (Scrima et Wittinghofer, 2006).**

La superposition de cette structure avec la structure de Ras en interaction avec Ras GAP montre que le potassium mimerait l'arginine de Ras GAP, confirmant le rôle de « GAP » chimique du potassium. Chez MnmE, le potassium stabilise le dimère et entraîne le repositionnement d'un glutamate qui pourrait alors jouer le même rôle que la glutamine catalytique de ras (remplacé par un résidu hydrophobe chez MnmE) en interagissant avec la molécule d'eau catalytique (2 molécules d'eau en ligne pour MnmE, proposant ainsi un mécanisme d'hydrolyse alternatif à celui proposé pour les GTPases de la famille Ras (Scrima et Wittinghofer, 2006) (cf. Figure 50).

Dans notre cas, YphC ne semble pas former de dimère. Des expériences d'ultracentrifugation analytiques ou de gel filtration ont été menées en présence de potassium ou de sodium et de nucléotides mais n'ont pas révélé la présence de dimère ou multimère. YphC possède déjà deux domaines G en tandem, et les structures 3D montrent une orientation différente du domaine 1 selon qu'il fixe un GDP ou non. Aucune structure avec du GTP ou un nucléotide analogue n'a été résolue et 1 GDP a toujours été retrouvé dans le domaine 2. On ne peut cependant pas exclure l'hypothèse que le domaine 2 s'oriente différemment en présence de GMPPNP ou de GDP-AlFx et puisse venir former un dimère avec GD1. Toutefois, le mouvement entre GD1 et GD2 est facilité par la présence d'une boucle entre les deux domaines ce qui n'est pas le cas entre GD2 et KH et le domaine KH pourrait gêner l'interaction entre les deux domaines.

Récemment, une activation par le potassium a également été décrite pour une autre GTPase, YqeH. Cette GTPase appartient également à la famille des HAS-GTPases et présente une permutation circulaire des motifs spécifiques des GTPases. Elle est impliquée dans la biogénèse de la sous-unité 30S du ribosome. Dans le cas de cette GTPase, le potassium stabiliserait également l'état de transition mais cette stabilisation ne passerait pas par une dimérisation de la protéine (Anand *et al.*, 2010), rejoignant plutôt le mécanisme d'activation qui se produit pour YphC.

### **3-Essais de dénaturation thermique**

Les essais réalisés en « thermal shift assay » avaient pour but non seulement de vérifier la stabilité des protéines, mais aussi de voir l'effet des nucléotides sur la stabilité de la protéine

avant d'entreprendre des essais de cristallogenèse et si la fixation du potassium seule pouvait engendrer un changement conformationnel important.

Ces expériences ont montré l'effet stabilisateur du potassium, mais un effet équivalent du sodium a été observé. Ainsi la fixation du potassium au niveau de la K-loop dans YphC n'induirait pas de changements conformationnels importants, suggérant que la protéine ne dimériserait pas en présence de potassium ou alors que cette dimérisation aurait lieu également en présence de sodium. Cette hypothèse paraît improbable. D'autre part, le GDP a un effet de stabilisation plus important que le GMPPNP soulignant que la conformation GDP lié de la protéine est plus stable que la conformation GTP lié. Ceci pourrait expliquer pourquoi la conformation GDP lié est plus facilement cristallisable. En effet, dans le cadre d'une collaboration avec Dominique Housset et Jean-Baptiste Reiser, à l'IBS, nous avons pu obtenir des cristaux d'YphC en présence de GDP qui diffractent à 2,4 Å. Ce qui n'a pas encore été le cas en présence de GMPPNP.

Les mutants de la lysine du motif G1 se comportent de la même façon que la protéine native en présence de sels et il serait intéressant de voir si ces mutations induisent un changement de comportement vis-à-vis des nucléotides.

Le domaine GD1 présente une stabilité bien meilleure que celle de la protéine entière et à l'inverse, GD2-KH est un peu moins stable. Ceci est corrélé avec ce que nous avons pu observer au cours des différentes expériences réalisées et peut expliquer pourquoi nous n'avons pas réussi à obtenir les mutant ponctuels sur GD2-KH en fraction soluble. En effet, si les mutations entraînent une déstabilisation du site catalytique de GD2-KH, la protéine serait alors d'autant moins stable et plus rapidement dénaturée.

Là encore, les essais en présence de nucléotides peuvent s'avérer importants car si la présence de nucléotide améliore la stabilité de GD2-KH, cela pourrait nous donner des pistes sur l'optimisation des conditions d'obtention des mutants solubles.

#### **4-Interaction avec les ribosomes**

Nous avons montrés que YphC et ses domaines séparés sont capables d'interagir avec les ribosomes. Cette interaction est nucléotide-dépendante, au moins pour la protéine native. Des études ont été publiées montrant que EngA de *E. coli* était capable d'interagir avec la sous unité 50S (Bharat *et al.*, 2006; Hwang et Inouye, 2006) et suggérait que la protéine entière

avait besoin des deux domaines pour assumer son rôle *in vivo*. Plus récemment, ces mêmes auteurs ont montré que YphC nécessite son domaine KH pour interagir avec la sous-unité 50S chez *E. coli* (Hwang et Inouye, 2010). Toutefois, nos résultats préliminaires montrent que GD1 est aussi capable d'interagir avec les ribosomes totaux. Ceci suggère que le domaine KH n'est pas nécessaire à l'interaction avec les ribosomes, ou bien que la protéine est capable d'interagir avec différentes régions du ribosome et que si le KH est absolument nécessaire à l'interaction avec la sous unité 50S, alors GD1 peut interagir avec l'autre sous unité, 30S ou bien encore avec le ribosome entier.

Nous avons mené d'autres expériences d'interaction avec les ribosomes dans différentes conditions saline et en présence de différents nucléotides. Ces expériences ont produit des résultats préliminaires difficilement interprétables. Toutefois, dans certaines conditions, nous observions une interaction avec la sous unité 30S. Ces expériences nécessiteraient d'être reproduites avant de pouvoir en tirer des conclusions.

Cependant, une étude récente a montré que YphC de *Bacillus subtilis* serait capable d'interagir avec la sous unité 30S du ribosome et ce également de façon nucléotide-dépendante. (Tomar *et al.*, 2009). Les auteurs montrent que la fixation du GTP au niveau du GD2 est un pré-requis à l'interaction avec la sous-unité 50S mais qu'en absence de GD1 (l'équivalent de notre construction GD2-KH) la protéine était capable d'interagir avec la sous unité 30S, 50S et le ribosome entier 70S. Ces expériences corroborent ce que nous avons observé bien qu'ils ne suggèrent pas l'interaction directe du GD1 avec les ribosomes. Ils montrent également l'interaction de EngA avec les ARNr 23S et 16S et proposent que GD1 utiliserait l'hydrolyse du GTP pour moduler l'interaction de la protéine avec une sous unité ribosomique ou une autre. Toutefois dans ce travail, les auteurs basent leur théorie sur l'absence de fixation de nucléotide au niveau du site muté, et postulent que les mutants de la lysine du motif A de Walker ne fixent plus du tout le GTP ou le GDP et les vérifications faites par fluorescence ne sont pas convaincantes. Or, dans notre travail, nous avons montré que les mutants de cette lysine sont capables de fixer au moins du GDP. D'autre part, les mutants de l'aspartate du motif 4 réalisé dans cette étude sont équivalents aux mutations des aspartates que nous avons faits et les résultats que nous avons obtenus en activité en présence de XTP ne sont pas concluants.

En outre, nous pouvons nous demander pourquoi la bactérie utiliserait le domaine le plus actif pour moduler la fonction. De plus, l'interaction avec les ARNr proposés par Tomar et ses collaborateurs, l'interaction avec les protéines S7 et S9 chez *Salmonella* (Lamb *et al.*, 2007) et

les profils protéiques de la sous unité 50S altérée (Schaefer *et al.*, 2006) supposent que les mécanismes d'interaction sont plus complexes que ce qui est proposé pour l'instant et le rôle exact de YphC dans la biogenèse du ribosome, ainsi que les mécanismes réactionnels sont encore obscurs et restent à élucider.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES





Dans cette étude, nous avons mis au point les conditions de production et de purification de YphC et de ses mutants en grande quantité avec un rendement de 40 à 80 mg de protéine purifiée par litre de culture.

Nous avons ensuite étudié la protéine par des méthodes spectroscopiques. Nous avons pu ainsi mesurer ses constantes cinétiques et ses constantes d'affinités pour les nucléotides dans différentes conditions. Le  $K_M$  mesuré est en corrélation avec les valeurs trouvées dans la littérature pour les protéines orthologues, par contre, la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) observée est supérieure. Les constantes de dissociation mesurées montrent que la protéine a une affinité faible pour les nucléotides et que les méthodes utilisées ne permettent pas de discriminer les deux domaines. L'étude des mutants générés a permis d'établir que le domaine GD1 est très actif et qu'il est le principal responsable de l'hydrolyse du GTP ; toutes les mutations générées au niveau de ce domaine sont délétères pour l'activité hydrolytique du GTP de YphC.

Le domaine GD2 en revanche possède une activité d'hydrolyse faible et jouerait plutôt un rôle de régulateur de l'activité GTPase de la protéine. En effet, tous les mutants générés au niveau du deuxième domaine possèdent une activité GTPasique altérée par rapport à la protéine WT ou au domaine GD1 seul (excepté pour le mutant du tryptophane 296).

Nous avons montré que les mutants des lysines du motif A de Walker sont toujours capables de fixer les nucléotides et que leurs affinités pour les nucléotides semblent peu altérées (dans le cas de la protéine entière). L'étude de certains de ces mutants doit cependant être approfondie et les études par microcalorimétrie doivent être poursuivies afin de mesurer les affinités respectives des deux domaines dans le contexte de la protéine entière de façon plus précise.

Nous avons ensuite montré que la protéine est fortement activée par la présence de potassium et que cette activation n'influence pas l'affinité pour les nucléotides dans les conditions utilisées. Le potassium agirait de la même façon qu'une GAP, en amenant une charge positive supplémentaire dans le site et serait donc un élément activateur de certaines GTPases et en l'occurrence des GTPases de la famille de EngA.

Par ailleurs, nous avons montré que le potassium, comme le sodium, stabilise la protéine mais moins que la présence des nucléotides. Nous avons pu constater que le GDP avait un effet stabilisateur plus important que le GTP. Nous n'avons pas pu déterminer si le potassium était

capable de se fixer indépendamment du nucléotide et nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet autre du potassium sur YphC que celui observé sur l'activité GTPase. Il serait intéressant d'obtenir une structure de la protéine en présence de potassium afin de mieux identifier les résidus impliqués dans l'interaction avec la K-loop et de préciser les conformations des deux domaines en présence de cet activateur. De plus, une structure de la protéine en présence de GTP ou de GMPPNP serait intéressante afin de mieux comprendre les mécanismes réactionnels de la protéine et la communication entre les deux domaines. Des essais ont d'ores et déjà été menés en collaboration avec Dominique Housset et Jean-Baptiste Reiser à l'IBS. Pour l'instant, une structure à 2,4 Å de la protéine a été obtenue, en présence de GDP mais sans potassium et confirme la structure de YphC déjà publiée. Les essais vont être poursuivis afin d'obtenir d'autres conformations de YphC.

D'un point de vue fonctionnel, nous avons montré que YphC est capable d'interagir avec les ribosomes et que cette interaction dépend de la nature du nucléotide présent. Nous avons par ailleurs observé une interaction du GD1 seul et du GD2-KH avec les ribosomes, mais ce résultat doit être confirmé. L'effet du potassium sur cette interaction sera étudié par la suite.

L'interaction des protéines mutantes produites avec les ribosomes sera également étudiée par la suite.

Nous envisageons de générer une souche mutante conditionnelle où le gène de YphC serait sous le contrôle du promoteur inductible au xylose afin d'étudier l'effet de ces mutations *in vivo*. La construction des plasmides nécessaires pour obtenir cette souche a déjà commencé.

La détermination des partenaires ribosomiques et cellulaire de YphC est envisagée.

De plus, EngA est apparue phosphorylée dans deux études de phosphoprotéome. L'étude de la phosphorylation de YphC, l'effet de cette phosphorylation sur l'activité GTPasique de la protéine et sur l'interaction avec les ribosome est envisagée. Des expériences ont déjà démarrées dans ce sens et une phosphorylation par la protéine kinase PrkC de *B. subtilis* a été mise en évidence *in vitro* par nos collaborateurs Anne Galinier et Céline Freton à Marseille et Christophe Grangeasse à Lyon. Une autre protéine kinase étudiée au laboratoire, YdiB, semble être capable de phosphoryler YphC. Il serait intéressant de voir si YphC possède un ou plusieurs sites de phosphorylation et dans quelle mesure ces phosphorylations régulent l'activité et la fonction de YphC.

# BIBLIOGRAPHIE



- Ahn, J., March, P.E., Takiff, H.E., and Inouye, M. (1986) A GTP-binding protein of *Escherichia coli* has homology to yeast RAS proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8849-8853.
- Akiyama, T., Gohda, J., Shibata, S., Nomura, Y., Azuma, S., Ohmori, Y., Sugano, S., Arai, H., Yamamoto, T., and Inoue, J. (2001) Mammalian homologue of *E. coli* Ras-like GTPase (ERA) is a possible apoptosis regulator with RNA binding activity. *Genes Cells* **6**: 987-1001.
- Allin, C., and Gerwert, K. (2001) Ras catalyzes GTP hydrolysis by shifting negative charges from gamma- to beta-phosphate as revealed by time-resolved FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* **40**: 3037-3046.
- Anand, B., Surana, P., and Prakash, B. (2010) Deciphering the catalytic machinery in 30S ribosome assembly GTPase YqeH. *PLoS One* **5**: e9944.
- Bardwell, J.C., Regnier, P., Chen, S.M., Nakamura, Y., Grunberg-Manago, M., and Court, D.L. (1989) Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing. *Embo J* **8**: 3401-3407.
- Bashan, A., and Yonath, A. (2008) Correlating ribosome function with high-resolution structures. *Trends Microbiol* **16**: 326-335.
- Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J., and Rabinowitz, J.D. (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **5**: 593-599.
- Bharat, A., Jiang, M., Sullivan, S.M., Maddock, J.R., and Brown, E.D. (2006) Cooperative and critical roles for both G domains in the GTPase activity and cellular function of ribosome-associated *Escherichia coli* EngA. *J Bacteriol* **188**: 7992-7996.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- Britton, R.A., Powell, B.S., Court, D.L., and Lupski, J.R. (1997) Characterization of mutations affecting the *Escherichia coli* essential GTPase era that suppress two temperature-sensitive dnaG alleles. *J Bacteriol* **179**: 4575-4582.
- Britton, R.A., Powell, B.S., Dasgupta, S., Sun, Q., Margolin, W., Lupski, J.R., and Court, D.L. (1998) Cell cycle arrest in Era GTPase mutants: a potential growth rate-regulated checkpoint in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 739-750.
- Britton, R.A. (2009) Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annu Rev Microbiol* **63**: 155-176.
- Brodersen, D.E., and Nissen, P. (2005) The social life of ribosomal proteins. *Febs J* **272**: 2098-2108.
- Brown, E.D. (2005) Conserved P-loop GTPases of unknown function in bacteria: an emerging and vital ensemble in bacterial physiology. *Biochem Cell Biol* **83**: 738-746.
- Campbell, T.L., Daigle, D.M., and Brown, E.D. (2005) Characterization of the *Bacillus subtilis* GTPase YloQ and its role in ribosome function. *Biochem J* **389**: 843-852.
- Cepus, V., Scheidig, A.J., Goody, R.S., and Gerwert, K. (1998) Time-resolved FTIR studies of the GTPase reaction of H-ras p21 reveal a key role for the beta-phosphate. *Biochemistry* **37**: 10263-10271.
- Chakrabarti, P.P., Daumke, O., Suveyzdis, Y., Kotting, C., Gerwert, K., and Wittinghofer, A. (2007) Insight into catalysis of a unique GTPase reaction by a combined biochemical and FTIR approach. *J Mol Biol* **367**: 983-995.
- Chen, J.M., Lee, G., Brandt-Rauf, P.W., Murphy, R.B., Rackovsky, S., and Pincus, M.R. (1990a) Comparison of the predicted structure for the activated form of the P21 protein with the X-ray crystal structure. *J Protein Chem* **9**: 543-547.

- Chen, S.M., Takiff, H.E., Barber, A.M., Dubois, G.C., Bardwell, J.C., and Court, D.L. (1990b) Expression and characterization of RNase III and Era proteins. Products of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 2888-2895.
- Chen, X., Court, D.L., and Ji, X. (1999) Crystal structure of ERA: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8396-8401.
- Connolly, K., and Culver, G. (2009) Deconstructing ribosome construction. *Trends Biochem Sci* **34**: 256-263.
- Culver, G.M., and Noller, H.F. (1999) Efficient reconstitution of functional *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *Rna* **5**: 832-843.
- Daigle, D.M., and Brown, E.D. (2004) Studies of the interaction of *Escherichia coli* YjeQ with the ribosome in vitro. *J Bacteriol* **186**: 1381-1387.
- Der, C.J., Finkel, T., and Cooper, G.M. (1986) Biological and biochemical properties of human *rasH* genes mutated at codon 61. *Cell* **44**: 167-176.
- Dinos, G., Kalpaxis, D.L., Wilson, D.N., and Nierhaus, K.H. (2005) Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Res* **33**: 5291-5296.
- Exley, R., Zouine, M., Pernelle, J.J., Beloin, C., Le Hegarat, F., and Deneubourg, A.M. (2001) A possible role for L24 of *Bacillus subtilis* in nucleoid organization and segregation. *Biochimie* **83**: 269-275.
- Foti, J.J., Persky, N.S., Ferullo, D.J., and Lovett, S.T. (2007) Chromosome segregation control by *Escherichia coli* ObgE GTPase. *Mol Microbiol* **65**: 569-581.
- Frank, J., and Agrawal, R.K. (2001) Bacterial Ribosomes. *Encyclopedia of science*.
- Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997) GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 786-792.
- Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M., and Scolnick, E.M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5704-5708.
- Gil, R., Silva, F.J., Pereto, J., and Moya, A. (2004) Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 518-537.
- Golden, B.L., Ramakrishnan, V., and White, S.W. (1993) Ribosomal protein L6: structural evidence of gene duplication from a primitive RNA binding protein. *Embo J* **12**: 4901-4908.
- Gollop, N., and March, P.E. (1991) A GTP-binding protein (Era) has an essential role in growth rate and cell cycle control in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 2265-2270.
- Green, R., and Noller, H.F. (1996) In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *Rna* **2**: 1011-1021.
- Grishin, N.V. (2001) KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res* **29**: 638-643.
- Hang, J.Q., Meier, T.I., and Zhao, G. (2001) Analysis of the interaction of 16S rRNA and cytoplasmic membrane with the C-terminal part of the *Streptococcus pneumoniae* Era GTPase. *Eur J Biochem* **268**: 5570-5577.
- Held, W.A., Ballou, B., Mizushima, S., and Nomura, M. (1974) Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J Biol Chem* **249**: 3103-3111.
- Herold, M., and Nierhaus, K.H. (1987) Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem* **262**: 8826-8833.

- Hisabori, T., Yoshida, M., and Sakurai, H. (1986) ADP binding to TF1 and its subunits induces ultraviolet spectral changes. *J Biochem* **100**: 663-670.
- Hosokawa, K., Fujimura, R.K., and Nomura, M. (1966) Reconstitution of functionally active ribosomes from inactive subparticles and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**: 198-204.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2001) An essential GTPase, Der, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **276**: 31415-31421.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2006) The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**: 1660-1672.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2008) RelA functionally suppresses the growth defect caused by a mutation in the G domain of the essential Der protein. *J Bacteriol* **190**: 3236-3243.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2010) Interaction of an essential *Escherichia coli* GTPase, Der, with the 50S ribosome via the KH-like domain. *J Bacteriol* **192**: 2277-2283.
- Hwang, Y.W., and Miller, D.L. (1987) A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein. *J Biol Chem* **262**: 13081-13085.
- Inada, T., Kawakami, K., Chen, S.M., Takiff, H.E., Court, D.L., and Nakamura, Y. (1989) Temperature-sensitive lethal mutant of era, a G protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 5017-5024.
- Ingram, G.C., Simon, R., Carpenter, R., and Coen, E.S. (1998) The Antirrhinum ERG gene encodes a protein related to bacterial small GTPases and is required for embryonic viability. *Curr Biol* **8**: 1079-1082.
- Inoue, K., Alsina, J., Chen, J., and Inouye, M. (2003) Suppression of defective ribosome assembly in a rbfA deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: 1005-1016.
- Jiang, M., Datta, K., Walker, A., Strahler, J., Bagamasbad, P., Andrews, P.C., and Maddock, J.R. (2006) The *Escherichia coli* GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J Bacteriol* **188**: 6757-6770.
- Jiang, M., Sullivan, S.M., Wout, P.K., and Maddock, J.R. (2007) G-protein control of the ribosome-associated stress response protein SpoT. *J Bacteriol* **189**: 6140-6147.
- Johnstone, B.H., Handler, A.A., Chao, D.K., Nguyen, V., Smith, M., Ryu, S.Y., Simons, E.L., Anderson, P.E., and Simons, R.W. (1999) The widely conserved Era G-protein contains an RNA-binding domain required for Era function in vivo. *Mol Microbiol* **33**: 1118-1131.
- Jurnak, F., Heffron, S., and Bergmann, E. (1990) Conformational changes involved in the activation of ras p21: implications for related proteins. *Cell* **60**: 525-528.
- Kaczanowska, M., and Ryden-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 477-494.
- Kang, W.K., Icho, T., Isono, S., Kitakawa, M., and Isono, K. (1989) Characterization of the gene rimK responsible for the addition of glutamic acid residues to the C-terminus of ribosomal protein S6 in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **217**: 281-288.
- Knuth, K., Niesalla, H., Hueck, C.J., and Fuchs, T.M. (2004) Large-scale identification of essential *Salmonella* genes by trapping lethal insertions. *Mol Microbiol* **51**: 1729-1744.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Aravind, L. (2000) Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem* **54**: 245-275.
- Kressler, D., Hurt, E., and Babetaler, J. (2009) Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.



- Lamb, H.K., Thompson, P., Elliott, C., Charles, I.G., Richards, J., Lockyer, M., Watkins, N., Nichols, C., Stammers, D.K., Bagshaw, C.R., Cooper, A., and Hawkins, A.R. (2007) Functional analysis of the GTPases EngA and YhbZ encoded by *Salmonella typhimurium*. *Protein Sci* **16**: 2391-2402.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**: 41-72.
- Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol* **333**: 781-815.
- Lhoest, J., and Colson, C. (1981) Cold-sensitive ribosome assembly in an *Escherichia coli* mutant lacking a single methyl group in ribosomal protein L3. *Eur J Biochem* **121**: 33-37.
- Li, G., and Zhang, X.C. (2004) GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. *J Mol Biol* **340**: 921-932.
- Lin, Y.P., Sharer, J.D., and March, P.E. (1994) GTPase-dependent signaling in bacteria: characterization of a membrane-binding site for era in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 44-49.
- Loh, P.C., Morimoto, T., Matsuo, Y., Oshima, T., and Ogasawara, N. (2007) The GTP-binding protein YqeH participates in biogenesis of the 30S ribosome subunit in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet Syst* **82**: 281-289.
- Lu, Q., and Inouye, M. (1998) The gene for 16S rRNA methyltransferase (ksgA) functions as a multicopy suppressor for a cold-sensitive mutant of era, an essential RAS-like GTP-binding protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 5243-5246.
- Maeder, C., and Draper, D.E. (2005) A small protein unique to bacteria organizes rRNA tertiary structure over an extensive region of the 50 S ribosomal subunit. *J Mol Biol* **354**: 436-446.
- Maegley, K.A., Admiraal, S.J., and Herschlag, D. (1996) Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8160-8166.
- Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nystrom, T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- Mehr, I.J., Long, C.D., Serkin, C.D., and Seifert, H.S. (2000) A homologue of the recombination-dependent growth gene, rdgC, is involved in gonococcal pilin antigenic variation. *Genetics* **154**: 523-532.
- Meier, T.I., Peery, R.B., Jaskunas, S.R., and Zhao, G. (1999) 16S rRNA is bound to era of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 5242-5249.
- Meier, T.I., Peery, R.B., McAllister, K.A., and Zhao, G. (2000) Era GTPase of *Escherichia coli*: binding to 16S rRNA and modulation of GTPase activity by RNA and carbohydrates. *Microbiology* **146** ( Pt 5): 1071-1083.
- Meskauskas, A., and Dinman, J.D. (2007) Ribosomal protein L3: gatekeeper to the A site. *Mol Cell* **25**: 877-888.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S.H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**: 939-945.
- Milner-White, E.J., Coggins, J.R., and Anton, I.A. (1991) Evidence for an ancestral core structure in nucleotide-binding proteins with the type A motif. *J Mol Biol* **221**: 751-754.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.

- Mishra, R., Gara, S.K., Mishra, S., and Prakash, B. (2005) Analysis of GTPases carrying hydrophobic amino acid substitutions in lieu of the catalytic glutamine: implications for GTP hydrolysis. *Proteins* **59**: 332-338.
- Mittenhuber, G. (2001) Comparative genomics of prokaryotic GTP-binding proteins (the Era, Obg, EngA, ThdF (TrmE), YchF and YihA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, RAN, RAS and RHO families). *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 21-35.
- Morimoto, T., Loh, P.C., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2002) Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 3539-3552.
- Muench, S.P., Xu, L., Sedelnikova, S.E., and Rice, D.W. (2006) The essential GTPase YphC displays a major domain rearrangement associated with nucleotide binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12359-12364.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nierhaus, K.H., and Dohme, F. (1974) Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 4713-4717.
- Ozvegy, C., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* **277**: 47980-47990.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *Embo J* **9**: 2351-2359.
- Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., and Lambright, D.G. (2006) TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**: 303-306.
- Pasqualato, S., and Cherfils, J. (2005) Crystallographic evidence for substrate-assisted GTP hydrolysis by a small GTP binding protein. *Structure* **13**: 533-540.
- Polkinghorne, A., Hogan, R.J., Vaughan, L., Summersgill, J.T., and Timms, P. (2006) Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infections. *Microbes Infect* **8**: 61-72.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Powers, T., and Walter, P. (1995) Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* **269**: 1422-1424.
- Pragai, Z., and Harwood, C.R. (2000) YsxC, a putative GTP-binding protein essential for growth of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **182**: 6819-6823.
- Ramakrishnan, C., Dani, V.S., and Ramasarma, T. (2002) A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Eng* **15**: 783-798.
- Ramakrishnan, V., and Moore, P.B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 144-154.
- Raue, H.A., Lorenz, S., Erdmann, V.A., and Planta, R.J. (1981) Reconstitution of biologically active 50S ribosomal subunits with artificial 5S RNA molecules carrying disturbances in the base pairing within the molecular stalk. *Nucleic Acids Res* **9**: 1263-1269.
- Ravichandran, A., Sugiyama, N., Tomita, M., Swarup, S., and Ishihama, Y. (2009) Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics* **9**: 2764-2775.

- Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A., and Miller, J.H. (2001) The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6033-6038.
- Robinson, V.L., Hwang, J., Fox, E., Inouye, M., and Stock, A.M. (2002) Domain arrangement of Der, a switch protein containing two GTPase domains. *Structure* **10**: 1649-1658.
- Rohl, R., and Nierhaus, K.H. (1982) Assembly map of the large subunit (50S) of Escherichia coli ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 729-733.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434.
- Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K., and Wada, C. (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* **10**: 393-408.
- Sayed, A., Matsuyama, S., and Inouye, M. (1999) Era, an essential Escherichia coli small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 51-54.
- Schaefer, L., Uicker, W.C., Wicker-Planquart, C., Foucher, A.E., Jault, J.M., and Britton, R.A. (2006) Multiple GTPases participate in the assembly of the large ribosomal subunit in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **188**: 8252-8258.
- Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615-623.
- Schmeing, T.M., and Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**: 1234-1242.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., and Cate, J.H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**: 827-834.
- Schweins, T., and Wittinghofer, A. (1994) GTP-binding proteins. Structures, interactions and relationships. *Curr Biol* **4**: 547-550.
- Scott, W.G. (2007) Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 280-286.
- Scrima, A., and Wittinghofer, A. (2006) Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element. *Embo J* **25**: 2940-2951.
- Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2002) RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **415**: 662-666.
- Self, A.J., and Hall, A. (1995) Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol* **256**: 67-76.
- Sells, B.H., and Davis, F.C., Jr. (1968) Ribosome biogenesis: nonrandom addition of structural proteins to 50S subunits. *Science* **159**: 1240-1242.
- Shan, S.O., and Walter, P. (2003) Induced nucleotide specificity in a GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4480-4485.
- Sharma, M.R., Barat, C., Wilson, D.N., Booth, T.M., Kawazoe, M., Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Fucini, P., and Agrawal, R.K. (2005) Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit implications for 30S subunit assembly. *Mol Cell* **18**: 319-329.
- Shimamoto, T., and Inouye, M. (1996) Mutational analysis of Era, an essential GTP-binding protein of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **136**: 57-62.
- Sigal, I.S., Gibbs, J.B., D'Alonzo, J.S., Temeles, G.L., Wolanski, B.S., Socher, S.H., and Scolnick, E.M. (1986) Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 952-956.

- Sood, P., Lerner, C.G., Shimamoto, T., Lu, Q., and Inouye, M. (1994) Characterization of the autophosphorylation of Era, an essential *Escherichia coli* GTPase. *Mol Microbiol* **12**: 201-208.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R., and Wittinghofer, A. (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4944-4949.
- Sprang, S.R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* **66**: 639-678.
- Srivatsan, A., and Wang, J.D. (2008) Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* **11**: 100-105.
- Steitz, T.A. (2008) A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 242-253.
- Stouten, P.F., Sander, C., Wittinghofer, A., and Valencia, A. (1993) How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Lett* **320**: 1-6.
- Strunk, B.S., and Karbstein, K. (2009) Powering through ribosome assembly. *Rna* **15**: 2083-2104.
- Sullivan, S.M., Mishra, R., Neubig, R.R., and Maddock, J.R. (2000) Analysis of guanine nucleotide binding and exchange kinetics of the *Escherichia coli* GTPase Era. *J Bacteriol* **182**: 3460-3466.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., and He, Q.Y. (2009) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* **9**: 275-282.
- Takiff, H.E., Chen, S.M., and Court, D.L. (1989) Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 2581-2590.
- Talkington, M.W., Siuzdak, G., and Williamson, J.R. (2005) An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature* **438**: 628-632.
- Tan, J., Jakob, U., and Bardwell, J.C. (2002) Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* **184**: 2692-2698.
- Teixeira de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1997) Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments. *J Biotechnol* **59**: 117-126.
- Tomar, S.K., Dhimole, N., Chatterjee, M., and Prakash, B. (2009) Distinct GDP/GTP bound states of the tandem G-domains of EngA regulate ribosome binding. *Nucleic Acids Res* **37**: 2359-2370.
- Traub, P., and Nomura, M. (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**: 777-784.
- Tu, C., Zhou, X., Tropea, J.E., Austin, B.P., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2009) Structure of ERA in complex with the 3' end of 16S rRNA: implications for ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14843-14848.
- Uicker, W.C., Schaefer, L., and Britton, R.A. (2006) The essential GTPase RbgA (YlqF) is required for 50S ribosome assembly in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **59**: 528-540.
- Uicker, W.C., Schaefer, L., Koenigsnecht, M., and Britton, R.A. (2007) The essential GTPase YqeH is required for proper ribosome assembly in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 2926-2929.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys* **32**: 1-56.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Wicker-Planquart, C., Foucher, A.E., Louwagie, M., Britton, R.A., and Jault, J.M. (2008) Interactions of an essential *Bacillus subtilis* GTPase, YsxC, with ribosomes. *J Bacteriol* **190**: 681-690.
- Worbs, M., Wahl, M.C., Lindahl, L., and Zengel, J.M. (2002) Comparative anatomy of a regulatory ribosomal protein. *Biochimie* **84**: 731-743.
- Yamanaka, K., Hwang, J., and Inouye, M. (2000) Characterization of GTPase activity of TrmE, a member of a novel GTPase superfamily, from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **182**: 7078-7082.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 883-896.
- Zalacain, M., Biswas, S., Ingraham, K.A., Ambrad, J., Bryant, A., Chalker, A.F., Iordanescu, S., Fan, J., Fan, F., Lunsford, R.D., O'Dwyer, K., Palmer, L.M., So, C., Sylvester, D., Volker, C., Warren, P., McDevitt, D., Brown, J.R., Holmes, D.J., and Burnham, M.K. (2003) A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 109-126.
- Zhang, B., Zhang, Y., Shacter, E., and Zheng, Y. (2005) Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase--evidence for a GTP/GDP displacement model. *Biochemistry* **44**: 2566-2576.
- Zhong, J.M., Chen-Hwang, M.C., and Hwang, Y.W. (1995) Switching nucleotide specificity of Ha-Ras p21 by a single amino acid substitution at aspartate 119. *J Biol Chem* **270**: 10002-10007.

## Résumé :

Les grands programmes de séquençage des génomes ont révélé l'existence de nombreux gènes de fonction inconnue. L'invalidation systématique de ces gènes chez les bactéries a permis de révéler le caractère essentiel de certains d'entre eux. L'étude des protéines issues de ces gènes s'est amplifiée ces dernières années car elles sont des cibles potentiellement intéressantes pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes. YphC est une GTPase de *Bacillus subtilis* qui répond à ces critères. Elle est très conservée au sein des bactéries mais n'est pas retrouvée chez les organismes eucaryotes ou les archaebactéries, ce qui fait d'elle une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes. YphC a la particularité de posséder deux domaines GTPases en tandem. Unique en son genre, nous avons voulu étudier cette protéine sous son aspect biochimique afin de mieux comprendre son mécanisme de fonctionnement. Nous avons donc mis au point la production et la purification de YphC et généré des mutations ponctuelles ou des délétions. Nous avons ainsi pu mesurer les constantes enzymatiques de cette protéine et caractériser l'effet d'activation du potassium sur son activité d'hydrolyse du GTP. Nous avons ainsi montré la forte activité GTPase de la protéine portée par le premier domaine GTPase et le rôle régulateur du deuxième domaine GTPase. Nous avons également étudié le rôle de YphC par une approche *in vitro*. Nous avons pu ainsi montrer que YphC est capable d'interagir avec les ribosomes de façon nucléotide dépendante suggérant un rôle de la protéine dans les processus de biogenèse du ribosome.

Mots clés : GTPases, EngA, *Bacillus subtilis*, fluorescence, ribosome.

Title: **Biochemical characterization of YphC, a protein from *Bacillus subtilis* with two GTPases domains.**

## Abstracts

Genome sequencing programs have revealed many genes of unknown function. The systematic disruption of these genes revealed the essentiality for some of them. Studying orphan proteins became of first importance as they are ideal targets for new antibacterial compounds. YphC is a GTPase from *Bacillus subtilis* that meets these criteria. It is well conserved throughout bacterial kingdom but is not found in eukaryota or archeas, strengthening the choice of this protein as a future target for antibacterial drugs. YphC has the particularity to possess two GTPase domains in tandem. As a unique protein, we decided to study YphC from a biochemical point of view to better understand its catalytic mechanism. We overexpressed and purified the protein, either wild type or mutants. We measured its enzymatic constants and characterize potassium activation effect on its hydrolytic activity. We showed that YphC displays a high GTPase activity and that GD1 bears the majority of this activity .GD2 would thus have a regulatory role in the protein. We also studied the role of YphC *in vitro*. We showed that the protein was able to interact with ribosome from *Bacillus subtilis* in a nucleotide dependant manner, suggesting that YphC plays a role in ribosome biogenesis.

Keywords : GTPases, EngA, *Bacillus subtilis*, fluorescence, ribosome.